



UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali
Corso di Laurea Magistrale in
Produzioni Agroalimentari e Gestione degli Agroecosistemi

Tesi di Laurea

**Propagazione *in vitro* via embriogenesi somatica di
Iris pallida Lam. (Giaggiolo)**

Candidato: Francesco Elia Florio

Matricola: 457895

Relatori:

Prof. Fernando Malorgio

Dott.ssa Mariella Lucchesini

Correlatori:

Prof.ssa Mensuali-Sodi Anna

Anno Accademico 2015-16

Dichiarazione

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

Francesco Elia Florio

Firma

Data

INDICE

Riassunto	5
CAP.1. PARTE INTRODUTTIVA.....	8
La storia dell' <i>Iris</i>	8
1.1La classificazione botanica degli <i>Iris</i>	9
<i>Iris barbati</i>	11
1.2Impiego degli <i>Iris</i>	13
<i>Iris pallida</i> Lam. e oli essenziali.....	14
CAP.2. COLTIVAZIONE DEL GIAGGIOLO	16
2.1La produzione d' <i>Iris pallida</i>	16
Areali di produzione.....	18
La valutazione della redditività	19
2.2Caratteristiche della coltura	20
Cure colturali.....	21
Raccolta dei rizomi	21
La mondata e l'affettatura	22
Estrazione degli oli essenziali.....	23
Avversità.....	24
2.3Propagazione.....	26
La riproduzione dell' <i>Iris</i>	26
La propagazione dall' <i>Iris pallida</i> Lam.....	27
Problematiche.....	30
Innovazione	31
CAP.3. LE COLTURE IN VITRO.....	32
Colture <i>in vitro</i> e micropropagazione.....	32
3.1Embriogenesi somatica	34
Ontogenesi dell'embriogenesi somatica e differenze tra embriogenesi somatica e zigotica.....	35
Embriogenesi somatica diretta e indiretta.....	39
Produzione di semi sintetici.....	40
3.2Micropropagazione dell' <i>Iris</i> spp.	41
L'embriogenesi somatica dell' <i>Iris pallida</i>	43
CAP.4. VARIABILITÀ SOMACLONALE	45
Definire la variabilità	45
4.1Tecniche per la valutazione delle variazioni somaclonali.....	46
Caratteri Morfologici.....	47

Analisi fisiologiche/biochimiche	47
Analisi Citologiche.....	48
Analisi Molecolari.....	48
Il caso dell' <i>I.pallida</i> Lam.....	49
Studio istologico degli embrioni di <i>I. pallida</i> Lam.....	49
CAP .5. CITOFUORIMETRIA	51
5.1Composizione del citometro a flusso	52
5.2La citometria a flusso nelle piante.....	54
Fluorocromi specifici per il DNA	55
Contenuto di DNA in nuclei in sospensione	55
5.3Interpretazione dei risultati.....	56
CAP.6. PARTE SPERIMENTALE	60
Obiettivi del lavoro	60
7.1MATERIALI E METODI	61
Valutazione dei mezzi di coltura e dell'andamento dell'embriogenesi	61
Studio istologico degli embrioni zigotici e somatici	63
Analisi chimica fine degli estratti di rizoma.....	65
Analisi citofluorimetrica di estratti purificati di nuclei	66
Estrazione dell'RNA.....	69
Caratterizzazione morfologica	69
Produzione semi sintetici.....	70
Analisi statistica	71
7.2RISULTATI E DISCUSSIONI	72
Valutazione dei mezzi di coltura e dell'andamento dell'embriogenesi	72
Studio istologico degli embrioni zigotici e somatici	75
Analisi biochimica degli estratti di rizoma	78
Analisi citofluorimetrica di estratti purificati di nuclei	80
Estrazione dell'RNA.....	87
Caratterizzazione morfologica	87
Produzione di semi sintetici.....	88
CONCLUSIONI	90
BIBLIOGRAFIA	92
Ringraziamenti.....	99

Riassunto

Il genere *Iris* è il più grande presente all'interno delle *Iridaceae*, raggruppando nel suo insieme più di 300 specie di piante erbacee. Il genere *Iris*, originario del Giappone e dell'areale mediterraneo, presenta un notevole sviluppo e una localizzazione sudequatoriale, ma è presente su tutto il globo per la diffusione operata dall'uomo. Alcune specie d'*Iris*, quali *Iris pallida*, l'*Iris germanica* ed *Iris florentina* sono indicate con il nome di Giaggioli. L'*I. pallida* viene coltivata con il fine di ottenere oli essenziali, comunemente indicate con il nome di “profumo di violetta”, apprezzati e ricercati dalle industrie profumiere della Provenza. Questa preziosa essenza viene sintetizzata nei rizomi, per semplice degradazione ossidativa degli iridali, i precursori degli ironi (composti chetonici responsabili del profumo). Gli ironi non sono presenti nei rizomi al momento della raccolta: il processo biochimico che porta alla loro formazione è estremamente lento, tanto che quantità accettabili di ironi si accumulano solo dopo un periodo di stagionatura che varia da tre a quattro anni. I rizomi ottenuti sono in seguito sottoposti a particolari processi chimici che consentono di concentrare per gradi l'essenza profumata fino ad ottenere l'assoluta d'*Iris*, una sostanza contenente l'80% di ironi. Il valore dell'assoluta di *Iris* si aggira intorno ai cinquantamila euro al chilogrammo, ciò non deve stupire se si pensa che per ottenere 0,3-0,4 grammi di assoluta è necessario un chilogrammo di rizoma ben stagionato. In Toscana il giaggiolo viene coltivato in zone tipiche, quali i monti del Chianti e le pendici del Pratomagno nell'aretino. I rizomi provenienti da queste zone sono estremamente apprezzati e richiesti dalle industrie profumiere, che li preferiscono a quelli provenienti da Marocco, India e Cina. Le elevate richieste di rizomi rendono indispensabile un aumento delle produzioni, limitate da metodi di propagazione, di tipo vegetativo, che prevedono l'utilizzo dei rizomi per la produzione delle barbatelle. Per ottenere colture di giaggiolo di elevato pregio, assicurare elevati standard qualitativi e quantitativi, è necessaria un'attività di selezione varietale, accompagnata da metodi di propagazione veloci, ripetibili e affidabili. Tra le tecniche di propagazione offerte dal panorama tecnologico contemporaneo, le tecniche di micropropagazione *in vitro* risultano essere le più adatte. In particolare la tecnica utilizzata è comunemente indicata con il termine di embriogenesi somatica, un particolare tipo di coltura *in vitro*, che permette di ottenere embrioni non-zigotici, da un tessuto indifferenziato chiamato callo.

Per realizzare un protocollo per la micropropagazione via embriogenesi somatica dell'*I. pallida* è stato condotto uno studio svolto dal team guidato dal Prof. Malorgio e dalla

Dott.ssa Lucchesini dell'Università di Pisa e dalla Prof.ssa Mensuali della Scuola Superiore Sant'Anna. Lo sviluppo della micropropagazione dell'*Iris pallida* si pone come obiettivi quelli di fornire uno strumento efficace ed economicamente vantaggioso per le aziende leader in questo settore. Questo studio è stato basato sull'induzione dell'embriogenesi somatica su tessuti provenienti dai boccioli delle piante madri e da frammenti di foglie di plantule sviluppate *in vitro*. I primi dati ottenuti, relativi all'inquinamento degli espianti, hanno evidenziato che il bocciolo (fiore immaturo) è il miglior candidato per i test iniziali di induzione. Oltre ad aver testato differenti tipi di espianti (parti del bocciolo), sono stati condotti esperimenti su mezzi d'induzione che differiscono tra loro per la tipologia e la concentrazione dei regolatori di crescita, nonché dei componenti organici. Il mezzo di MS modificato contenente 0,1 mg L⁻¹ di chinetina (Kin) e 1 mg L⁻¹ acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4D) come mezzo di induzione per gli espianti dei fiori immaturi è risultato essere il più idoneo. Un altro mezzo MS modificato contenente 1 mg L⁻¹ di Kin e 1 mg L⁻¹ di 2,4D è risultato essere il più adatto per le colture successive di callo embriogenico. Per far sviluppare gli embrioni e mantenerne la formazione è stato utilizzato come mezzo d'espressione, un mezzo Knudson C modificato, addizionato con 1 mg L⁻¹ Kin e 0,1 mg L⁻¹ acido indol-3-butirrico (IBA). Trasferendo gli embrioni ottenuti su un mezzo MS modificato contenente 0,1 mg L⁻¹ di 6-benziladenina (BA) e acido α -naftalenacetico (NAA), è stato possibile ottenere plantule complete *in vitro*, da destinare all'acclimatazione *ex vitro*. La possibilità di indurre la formazione di callo embriogenico su espianti di foglie da plantule micropropagate (sterili e disponibili tutto l'anno) ha permesso di ottimizzare il processo di produzione. Il ciclo di propagazione via embriogenesi somatica è stato analizzato in dettaglio a partire da colture di callo ottenuto attraverso l'induzione di tessuti provenienti da plantule allevate *in vitro* di Giaggiolo toscano per sei subcolture successive al termine delle quali non era più possibile indurre la formazione di embrioni sul callo. Sulle piante ottenute sono state effettuate analisi chimiche attraverso metodologia HPLC che hanno consentito di verificare che tale metodo di propagazione non ha effetti sulla presenza degli iridali. È stata svolta una caratterizzazione istologica degli embrioni somatici. Sono stati valutati, attraverso metodo fluorocitometrico, i contenuti di DNA al fine di comparare le piante madri e le piante rigenerate dal *vitro*. Tale analisi ha provato l'assenza di variazioni nella ploidia delle piante di *I. pallida* che vengono propagate con questo sistema. È stata realizzata l'estrazione di RNA dalle foglie per il sequenziamento con metodo ILLUMINA al fine di valutare i profili di espressione di alcuni geni implicati nella via di biosintesi dei triterpeni.

Infine sono stati prodotti dei semi artificiali, ottenuti inserendo gli embrioni somatici in capsule di alginato. Questi sono stati in grado di mantenere vitali gli embrioni e di permettere la loro conservazione per lunghi periodi.

In definitiva considerando che un bocciolo potrebbe fornire una media di dodici espianti, i nostri risultati hanno dimostrato che in un ciclo della durata di sei mesi possono essere prodotte circa 150 piantine, con la possibilità di attuare altri cicli partendo dalle foglie delle plantule ottenute. Il callo ottenuto da queste foglie ha una capacità embriogenetica di circa 30 embrioni/g di callo ed una germinazione degli embrioni del 50%. Da 1 grammo di espianti fogliari prelevati dalle piante *in vitro*, è possibile ottenere in circa 60 giorni 8 g di callo embriogenico, in grado di fornire in altri 20 giorni oltre 200 embrioni e quindi circa 100 piantine da acclimatare *ex vitro*. Le piante ottenute non presentano variazioni rilevanti dal punto di vista agronomico e produttivo. La possibilità di produrre semi artificiali potrà essere utilizzata per trasporto e/o scambio di materiale, in condizioni di asepsi e con una buona vitalità, nonché per la conservazione del germoplasma.

CAP.1. PARTE INTRODUTTIVA

La storia dell'*Iris*

Iris, è una parola di origine greca che deriva dal nome di una Dea: *Iride*, la messaggera degli Dei, che sciogliendo la sua sciarpa formava l'arcobaleno. Secondo la mitologia greca, *Iris* figlia di Taumante fu collocata da quest'ultimo accanto a Giunone, per essere ambasciatrice di "buone nuove". La Dea, per ricompensare i servigi della fanciulla, le affidò il compito di avvisare gli uomini quando si era placata la collera degli Dei e quindi la fine della tempesta. Per questo nell'ottocentesco linguaggio dei fiori l'*Iris* significa "buona nuova". Tale nome fu attribuito da Carlo Linneo al genere nel 1753, prendendo spunto dal nome tradizionalmente utilizzato fin dall'antichità per indicare questo gruppo di piante. Linneo è anche responsabile della classificazione di alcune tra le più importanti specie del genere *Iris*, come *I. germanica* e *I. fiorentina*, che classificò attribuendogli questi nomi con l'intento di indicare la vera, o spesso presunta zona di provenienza. Molti altri nomi da lui attribuiti hanno riferimenti morfologici come ad esempio in *I. pumila* di taglia inferiore rispetto alle altre, *I. variegata* per la varietà dei fiori prodotti e *I. fetidissima* per l'odore sgradevole emanato dalle foglie se triturate. L'importanza dell'*Iris* nell'antichità è confermata dal ritrovamento di diversi testi che ne descrivono gli usi presso culture diverse, come ad esempio quelle buddista, ellenica ed ebraico-cristiana. L'importanza che l'*Iris* ha avuto nei confronti della cultura popolare può essere descritta attraverso l'analisi storica dello stemma di Firenze. Esso ha origini antichissime, risalenti molto probabilmente al popolo etrusco. Infatti Fiorenza o Florentina (nomi storici della città di Firenze), fu costituita colonia romana nel 45 a.C. presso un'antica città etrusca che fu così chiamata "a similitudine dei fiori e dei gigli che abbondanti fiorivano intorno alle sue mura" (Sani e Specht 1985). Lo stemma di Firenze, capitale mondiale della cultura e dei commerci in epoca rinascimentale, è noto in tutto il mondo sotto il nome di "giglio fiorentino". Il nome con il quale tale simbolo è passato alla storia è errato poiché non si tratta della stilizzazione di un giglio ma bensì di un "giaggiolo" (*Iris*). Fin dal 1251 l'insegna del comune era costituita da uno scudo o gonfalone vermiglio, con un "giglio" bianco in mezzo. Dopo la divisione in Guelfi e Ghibellini, questi ultimi si appropriarono dell'insegna del giglio bianco in campo rosso, i Guelfi per distinguersi, modificarono l'insegna in giglio rosso in campo bianco, insegna che è tuttora rimasta. A ciò si riferisce Dante, quando nel Paradiso fa dire all'avo Cacciaguیدا:

“Vid’io Fiorenza in sì fatto riposo,
che non avea cagione onde piangesse;
con queste genti vid’io glorioso
e giusto il popol suo tanto, che il giglio
non era ad asta mai posto a ritroso
né per division fatto vermiglio.”

(Dante Alighieri, *Divina Commedia, Paradiso, Canto XVI, 152.*)

Solo nella seconda metà de 700’ la coltura del giaggiolo diviene in Toscana e in particolare a Firenze, ‘*fiorente a fronte del lusso che spande in Europa*’ (Paoletti 1777).

Carlo Magno, primo Imperatore del Sacro Romano Impero, ne comandò la coltivazione in tutto il mondo conosciuto. Nonostante l’incremento delle colture d’*Iris* dettato dalle decisioni di Carlo Magno, non si può affermare che la coltivazione di queste piante abbia avuto inizio nel Medio Evo, essa si perde nella notte dei tempi. Già gli Egiziani, che lo coltivavano sulle sponde del Nilo, e poi i Greci e i Romani lo coltivavano in modo estensivo per utilizzarne i rizomi sia in medicina sia in profumeria.

Anche un’altra importante città, Lhasa, capitale del Tibet conserva riferimenti all’*Iris*. Antichissimi testi sacri riportano citazioni e rappresentazioni dell’*Iris* sotto il nome di *Shu-Tu-Wu*, che significa ‘venuto dal cielo’. Per i tibetani l’*Iris* rappresenta la Trinità che viene ancora oggi venerata. Leggenda narra che il primo *Iris* comparve in Tibet e da lì fu diffuso ad opera dei carovanieri in tutto il mondo e diversificato dalle condizioni ambientali.

1.1 La classificazione botanica degli *Iris*

Con il nome *Iris* si indica un genere di piante, appartenenti alla famiglia delle *Iridaceae* che contiene circa 92 generi e 1.800 specie. Ad essa appartengono piante erbacee perenni dotate di rizomi, bulbi o bulbo-tuberi, i fusti possono essere semplici o ramificati, le foglie sono lineari, appuntite all’estremità e parallelinervie. I fiori sono tutti bisessuali, vistosi, avvolti da giovani in una spata con 2 o più brattee, sono formati da 6 tepali saldati con un raggio di 8-10 cm. In dettaglio il fiore dell’*I. pallida* Lam è costituito da 2 serie di segmenti saldati alla base: i 3 segmenti esterni (sepali) colorati, larghi verso l’estremità e ristretti alla base, sono rivolti verso l’esterno; i 3 interni (petali) sono eretti; sopra ogni

sepalò si trova uno stame, e fra i due tipi di segmenti spuntano 3 stimmi petaloidei con stimma (**Figura 1.1**). Possiedono rizoma e radici avventizie. Il rizoma è strisciante, breve e tozzo, ramificato, emette in autunno le foglie. L'ovario è infero, composto da 3 carpelli fusi.

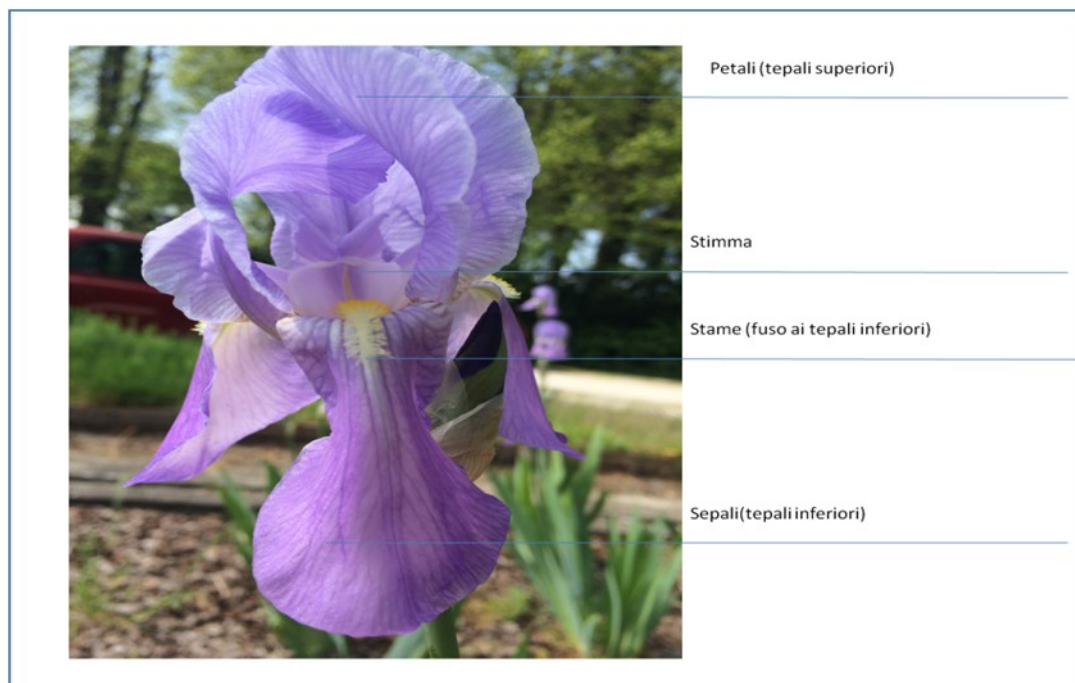


Figura 1.1: Schematizzazione del fiore dell'*I. pallida* Lam.

Il carattere fondamentale che distingue le *Iridaceae* dalle affini *Amaryllidaceae* è la presenza di soli tre stami, contro sei nella seconda famiglia (Regione Piemonte 2009).

Gli *Iris* hanno foglie ensiformi, lucide od opache disposte a ventaglio con colore variabile dal grigio-verde al verde scuro.

Secondo la classificazione adottata dalla “The Royal Horticultural Society”, botanicamente gli *Iris* sono suddivisi in molti sub-generi e sezioni. In orticoltura gli *Iris* si dividono semplicemente in due grandi gruppi: rizomatosi e bulbosi.

Gli *Iris* rizomatosi, dei quali fanno parte i giaggioli, si dividono in tre gruppi principali:

- *Iris* barbati;
- *Iris* senza barba;
- *Iris* crestati.

Proprio ai Barbati appartengono le tre specie di particolare interesse economico, in grado di accumulare notevoli quantità di ironi, le molecole responsabili del loro profumo. Esse

sono: *I. germanica*, *I. fiorentina*. e *I. pallida*.

Iris barbati

Gli *Iris barbati*, conosciuti anche come *Pogon Iris* sono caratterizzati dalla presenza di rizomi robusti e superficili che danno origine a ventagli di foglie spadiformi, generalmente aperte in superficie, i fusti possono essere semplici e ramificati. I fiori hanno lacinie esterne e interne molto sviluppate, con, al centro di ogni lacinia esterna, una barba sporgente di peli bianchi o colorati; possono avere vari colori.

- Barbati nani miniaturizzati: 20 cm.
- Barbati nani: 20-40 cm.
- Barbati medi: 40-70 cm.
- Barbati alti miniaturizzati: 40-65 cm.
- Barbati per bordure: 40-70 cm.
- Barbati alti: 70 cm e più.

Proprio ai Barbati medi appartengono le tre specie di particolare interesse economico, in grado di accumulare notevoli quantità di ironi, le molecole responsabili del loro profumo.

Esse sono: *I. germanica* e *I. fiorentina*. *I. pallida*.

- ***Iris germanica*, L.** È un *Iris* barbata alta sui 60-90 cm, con un fiore di colore azzurro-porpora intenso e con barba bianca.



Iris germanica L.
Image processed by Thomas Schoepke
www.plant-pictures.de

Figura 1.2: *Iris germanica* L. ([www. Plant-pictures.de](http://www.Plant-pictures.de))

- *Iris fiorentina*, L. forma albina dell'*Iris germanica*, per cui spesso classificata come varietà di questa, presenta fiori bianchi con tracce di celeste sulle ali e con le valve delle spate quasi completamente secche (Sani e Specht 1985). È una specie che molto probabilmente era diffusa già in epoca medioevale e a essa fu attribuito il significato di giglio araldico, che ritroviamo nello stemma della città di Firenze (Figura 1.3).



Iris germanica var. florentina Dykes
Image processed by Thomas Schoepke
www.plant-pictures.de

Figura 1.3: *Iris germanica* var. *florentina* D. ([www. Plant-pictures.de](http://www.Plant-pictures.de))

Iris pallida, Lam. È una specie con un rizoma quasi appiattito, che porta numerose radici nella parte inferiore. Le foglie sono lunghe 20-60 cm e sono ripiegate lungo la nervatura mediana. A primavera la pianta forma uno scapo florale che porta pochi fiori che sono avvolti da una spatula membranosa. Il fiore è formato da un perigonio di color viola pallido (**Figura 1.4**), che dopo un tratto tuboloso forma tre lacinie interne e tre lacinie esterne, le quali portano nella parte superiore una barba di peli gialli. Gli stami sono tre e l'antera, che di norma non produce il polline, è lunga come un filamento. Anche i carpelli sono tre e crescono in un ovario infero.



Iris pallida Lam.
Image processed by Thomas Schoepke
www.plant-pictures.de

Figura 1.4 *I. pallida* Lam. ([www. Plant-pictures.de](http://www.Plant-pictures.de))

1.2 Impiego degli *Iris*

Le presenza ubiquitaria del genere *Iris* su buona parte della superficie terrestre è dovuta principalmente alla bellezza ed ai colori dei fiori che in esso si ritrovano, però gli uomini non si sono occupati dell'*Iris* solo per la sua bellezza ed il suo fascino. È documentato che la coltivazione e la raccolta di queste piante non avevano scopi puramente ornamentali ma bensì la raccolta dei rizomi per le loro proprietà naturali, ed anche di tutte quelle proprietà che l'ignoranza, lo scetticismo e la ciarlataneria di sacerdoti e stregoni, conferivano a questa pianta. In particolar modo, nel Medio Evo, a causa della scarsa igiene, gli oli profumati assunsero particolare rilevanza grazie all'elevata capacità di fissaggio degli odori. Fino ad un secolo fa si usavano palline (cauteri) ottenute dai rizomi dell'*Iris* per

tenere aperte le ferite. Ancora oggi nelle campagne fiorentine ai bambini che mettono i primi denti vengono dati dei ciucci di rizoma (dentaroli), intagliati e seccati con funzioni antinfiammatoria ed emollienti. Tuttora alcune specie di *Iris* sono sfruttate commercialmente, rappresentando fonte di reddito per molte aziende in Italia e all'estero. Le principali attività economiche che interessano gli *Iris* sono: il fiore reciso, il vaso fiorito, il giardinaggio, ibridazione, collezionismo ed in fine, la più importante, la profumeria. In particolare gli *Iris* sono molto utilizzati per la produzione di metaboliti secondari, gli iridali, precursori degli ironi, responsabili del tipico profumo. Tra questi l'*I. pallida* ne fa da principe. Tra le specie coltivate per la produzione del fiore reciso quelle maggiormente usate fanno parte del genere *xiphium* (*Iris* bulbosi) e sono conosciute comunemente con i seguenti nomi: *Iris* di Spagna, *Iris* d'Olanda e *Iris* d'Inghilterra.

***Iris pallida* Lam. e oli essenziali**

L'*I. pallida* viene coltivato per la produzione di oli essenziali. L'organo utilizzato è il rizoma. Questi fusti sotterranei modificati contengono gli iridali, precursori triterpenici degli ironi (sesquiterpeni), che tramite metodi estrattivi molto particolari, permettono di ottenere gli oli essenziali dal caratteristico odore di violetta. Il nome di tale essenza deriva dal fiore di viola, nel quale gli ironi sono contenuti in quantità nettamente inferiore rispetto ai rizomi dei giaggioli. I distillati dei rizomi di *I. pallida*, utilizzati in profumeria, devono la loro fama appunto agli ironi, una classe di composti chetonici che si formano per degradazione ossidativa degli iridali. Analisi accurate dei distillati hanno dimostrato che il profumo di viola è dato dalla presenza di quattro molecole: cis- α -irone, trans- α -irone, β -irone e cis- γ -irone. Il processo ossidativo che porta alla formazione di queste molecole è estremamente lento, tanto che per avere una resa accettabile, i rizomi sono posti in magazzini ben areati per più di tre anni. Al termine di questo periodo i rizomi "pronti" vengono sottoposti alla faticosa estrazione, la quale è svolta prevalentemente dalle aziende profumiere che custodiscono con riservatezza le tecniche da loro utilizzate. Nel processo di produzione del "profumo di viola" si distinguono alcune attività peculiari, quali: la raccolta dei rizomi, la mondatura, l'affettatura, la stagionatura ed in fine l'estrazione dell'essenza. La specie d'*Iris* coltivata con queste finalità è pian piano divenuta in modo esclusivo l'*I. pallida*, perché capace di accumulare quantità di ironi superiori a quelle dell'*Iris germanica* e *Iris fiorentina*. Il giaggiolo italiano è molto apprezzato sul mercato internazionale, soprattutto in Francia per l'ottima qualità dell'essenza profumata che può

essere ottenuta. Esistono produzioni estere di rilevanza come quelle indiane, cinesi e marocchine di *I. pallida*. L'ingresso sul mercato del prodotto proveniente da queste regioni è probabilmente la principale causa di riduzione del prezzo di mercato dell'essenza. I rizomi sono utilizzati anche per la produzione di distillati alcolici (Gin Bombay) e di ciucci (succhiotti) per neonati, destinati quasi esclusivamente al mercato tedesco (sono utilizzati soprattutto per alleviare i disturbi provocati dalla dentizione). In quest'ultimo caso si usano soprattutto i rizomi dell'*I. pallida* appena sbucciati (rizomi bianchi detti anche, per ovvi motivi, dentaroli). La produzione dei "ciucci" è un'attività che ha origini antiche, nate probabilmente nelle campagne fiorentine. Il dentarolo è un rizoma prodotto dalle piante in coltivazione che non fioriscono (o lo fanno di rado) e che producono rizomi di forma rotonda, più facili da essiccare e lavorare.

CAP.2. COLTIVAZIONE DEL GIAGGIOLO

2.1 La produzione d'*Iris pallida*

Uno studio della filiera dell'*I. pallida* Lam. è stato realizzato nel 2010 dalla facoltà di economia dell'Università di Firenze, è emerso un quadro abbastanza omogeneo, costituito in prevalenza da aziende agricole a conduzione familiare o part-time, caratterizzate da un'attività produttiva promiscua, ossia non specializzate in una determinata produzione ma dedite alla lavorazione di più tipologie colturali. La maggior parte si occupa, infatti, in via prioritaria di oliveti e/o vigneti o comunque di altri generi di coltivazione che permettono di ottenere un guadagno principale al quale si aggiunge quello secondario della produzione del giaggiolo. Sono, infatti, relativamente poche le aziende che hanno campi interamente destinati alla coltura di questa specie che raggiunge una superficie totale mediamente di circa un ettaro. La tecnica di coltivare nello stesso appezzamento di terreno due o più specie, descritta come coltivazione consociata, non ha solo una funzione agronomica ma anche economica. Gli scopi della coltivazione consociata in questo caso sono:

1. Ottenere maggiori produzioni nell'appezzamento di terreno;
2. Un miglioramento qualitativo del prodotto;
3. Creare una protezione per le piante più deboli;
4. Ottenere reddito da più colture, assicurando una maggiore sicurezza;

Trattandosi il rizoma di *Iris* di un reddito "accessorio", nessuna azienda che produce *Iris* ha la necessità di conferire ogni anno il prodotto. E' stato stimato, dalle informazioni forniteci dall'Associazione Toscana Giaggiolo, che ogni anno di media sono solo un terzo le aziende che producono *Iris* che conferiscono i rizomi all'Associazione. Ciò avviene quando si verificano le migliori condizioni in termini di guadagno determinando notevoli oscillazioni del reddito da questo prodotto.

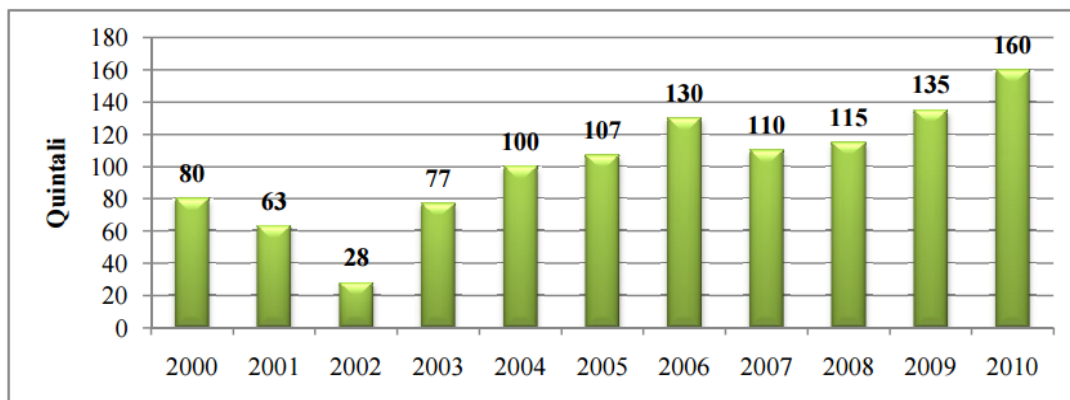
Fin dai primi anni del 900' sono stati raccolti i dati di produzione in quintali di rizomi prodotti. Dal 1900 ad oggi si è verificata una notevole diminuzione delle produzioni, riportate in **Tabella 2.1**, che ha avuto un picco negativo a fine anni 80' e primi anni 90'.

Tabella 1.1: Coltivazione del giaggiolo in Italia (Toscana e Veneto) dal 1891 al 1995: superfici e produzioni (elaborazione Fani, 2010)

ANNI	SUPERFICIE (HA)	PRODUZIONI (Q.li)
1891-1900	450	7000
1901-1910	700	10000
1911-1920	400	6000
1921-1930	350	4500
1951-1960	300	5000
1961-1970	240	4000
1971-1980	150	2500
1981-1995	100	1500
1990	120	1800-1900
1991	90	1300
1992	100	1500
1993	75	1100
1994	90	1300
1995	100	1400-1500

La crisi del mercato del giaggiolo ha portato negli anni passati a diverse riflessioni che hanno condotto a due principali motivazioni. In primo luogo, sembra che i compratori francesi dal 1989 abbiano iniziato ad acquistare, a prezzi inferiori, partite di rizoma provenienti da paesi extraeuropei (India, Cina e Marocco) e che le abbiano miscelate con quelle italiane, le quali hanno una qualità maggiore. La minor richiesta di rizomi d'*Iris* sarebbe dipesa anche dalla più esigua domanda di profumi, soprattutto di quelli a base di “assoluta d'*Iris*” a causa dei prezzi molto elevati. Dagli anni '90 in poi la domanda di rizoma d'*Iris* non ha più raggiunto i valori toccati in passato e ciò ha determinato la riduzione sia degli ettari dedicati alla sua coltura sia delle produzioni considerando anche che si tratta di una pianta il cui ciclo produttivo è come minimo di tre anni e la cui lavorazione (compresa quella del rizoma stesso) necessita di troppa manodopera. Tuttavia, negli ultimi 10 anni la richiesta di rizoma d'*Iris* non ha incontrato particolari momenti di crisi, anzi spesso i produttori toscani hanno dovuto affrontare situazioni per cui la domanda risultava essere di gran lunga superiore all'offerta. Nella **Tabella 2.2** sono indicate le quantità annuali di rizoma, bianco o nero, stimate dall'Associazione Toscana Giaggiolo, che mostrano un trend crescente.

Tabella 2.2: Quintali di rizoma di tipo nero prodotti dal 2000 al 2010 dalle aziende consorziate
(elaborazione: Associazione Toscana Giaggiolo, 2010)



Areali di produzione

Negli ultimi la coltivazione del Giaggiolo ha avuto un costante sviluppo in paesi quali il Marocco e in India settentrionale, con coltivazioni. In Italia le aziende produttrici di *I. pallida* sono di medie e piccole dimensioni. Queste coltivano i giaggioli in appezzamenti che difficilmente potrebbero essere destinati ad altre colture (ad esempio alla coltivazione della vite). Le aziende produttrici in Toscana sono concentrate in due aree collinari, una sulle pendici occidentali del Pratomagno aretino (Reggello, Pian di Scò, Castelfranco di Sopra e Loro Ciuffenna) e l'altra sulle colline del Chianti fiorentino (Greve, San Polo, Lamole e Radda) **Figura 2.1**. In queste aree le rese medie si aggirano sulle 4-12 t/ha. Dato che la resa dell'essiccazione varia dal 25 al 40%, se da 1 ettaro possiamo aspettarci 6-8 tonnellate di rizoma fresco potremo ottenere 1,5-3,2 t/ha di rizomi mondi e secchi (2,5-4 in caso di produzione molto buona).



Figura 2.1: Principali aree di coltivazione del giaggiolo in Toscana.

La valutazione della redditività

Il giaggiolo si propone come un'interessante possibilità per integrare il reddito delle tradizionali colture delle aziende agricole del Chianti e del Pratomagno (olio e/o vino). La tecnica di coltivazione richiede un consistente impiego di manodopera, concentrata per la maggior parte nella stagione primaverile per le sarchiature e nel periodo estivo autunnale per la raccolta, la mondatura e la piantagione. Redigere il bilancio di una coltura è sempre un'attività complessa, in quanto i dati a disposizione sono pochi e variabili. Ad esempio per ottenere un quintale di rizoma secco in tre anni sono indispensabili almeno 1500-2000 barbatelle, che quindi permettono di stimare facilmente il numero di ore necessarie e il costo d'impianto. Se invece si considerano le attività di manutenzione la stima delle ore di lavoro, i costi dei fitofarmaci e dei fertilizzanti necessari risulta di difficile determinazione. È stato stimato il reddito lordo derivante per due diversi tipi di produzione, il rizoma nero e quello bianco. Il rizoma nero ha un prezzo di mercato di 11,70 euro/Kg di rizoma stagionato, mentre il bianco di 15 euro/Kg. Per un partita di 100 kg di rizoma nero (che ha un valore di 1170,00 euro) ad esempio si ha un reddito lordo di 678,80, mentre per una partita di 100 Kg di rizoma bianco (valore 1500,00 euro) si ha un reddito lordo di 734,30 (Tesi Fani, 2010). Nell'ambito dell'analisi della filiera, sviluppato dall'Università di Firenze non sono stati considerati i costi necessari per l'acquisto del materiale di

propagazione, che è stato invece calcolato sulla base delle ore necessari all'impianto delle barbatelle. Un dato importante è che nonostante il rizoma bianco permetta di spuntare il reddito maggiore è quello meno prodotto. Esistono due motivi per spiegare questa scelta imprenditoriale: il primo riguarda la mancanza di know-how specifico per la sbucciature e il trattamento dei rizomi, il secondo è dovuto al fatto che le aziende della Provenza preferiscono il nero per ragioni economiche. In altre parole, il rizoma bianco è sottoposto a un forte rischio di mercato, poiché la sua domanda è inferiore rispetto al nero e produrne quantità superiori comporta un rischio maggiore (Fani, 2010).

2.2 Caratteristiche della coltura

L'Italia è ricca di terreni adatti alla coltivazione dei giaggioli. Si prestano bene i terreni caldi a scheletro prevalente, neutri e relativamente ricchi di sostanza organica. Il terreno ideale non dovrebbe essere troppo leggero, dovrebbe avere un buon contenuto in calcare e ricco di elementi nutritivi. Per quanto riguarda le condizioni di pH va sottolineato che i giaggioli sono piante che si adattano bene a diversi tipi di pH con un ottimo compreso tra 5 ed 8,5. Sono adatti i terreni calcarei nei limiti di pH riportati pocanzi. In terreni dove i giaggioli non sono mai stati coltivati, essi prosperano e fioriscono abbondantemente per due tre anni, poi per avere una fioritura abbondante e regolare è necessario provvedere ad opportune concimazioni. Il terreno va preparato almeno un mese prima della piantagione. Dato lo sviluppo superficiale dei rizomi, la preparazione dei terreni non prevede lavorazioni profonde, se non al fine di aumentare il drenaggio o se si fosse intenti ad effettuare lo scasso per la messa a coltura di un terreno vergine. Per la coltivazione dei giaggioli sono necessari dei terreni ben drenati. Il drenaggio artificiale risulta essenziale nei terreni di pianura, dove avvengono con facilità dei ristagni di acqua, se il drenaggio risultasse insufficiente, inefficace oppure oneroso, si può rimediare alzando il terreno con aiuole di 15-20 cm, sulle quali coltivare. I giaggioli sono piante di facile coltivazione e richiedono poche cure per la loro manutenzione ad eccezioni delle fasi di raccolta, trapianto e della caratteristica mondata. I giaggioli devono essere trapiantate con il rizoma affiorante per metà del suo spessore dal terreno, in luoghi ben soleggiati e ben drenati. Il sole deve colpire direttamente la parte superiore del rizoma e per far ciò è utile piantare i rizomi con orientamento Nord-Sud. In areali particolarmente caldi e per alcune varietà, può essere usato l'orientamento a levante in modo da ridurre l'esposizione nelle ore più calde del giorno. In zone particolarmente fredde può essere usato l'orientamento a

ponente. Nelle esposizioni completamente ombreggiate i giaggioli producono molte foglie e non fioriscono. Secondo l'esposizione scelta si avranno delle differenze nella fioritura: anticipata e breve per l'esposizione a Ovest, ritardata e lunga nell'esposizione a Est.

Cure culturali

Uno dei principali problemi della coltivazione del giaggiolo è rappresentato dalla presenza delle erbe infestanti. Per limitarne lo sviluppo possono essere eseguite due sarchiature all'anno, una a metà luglio e l'altra ad agosto, consistenti nel taglio o nel rimescolamento dello stato superficiale dell'interfila. La sarchiatura risulta di difficile meccanizzazione o causa della impervietà dei terreni solitamente destinati a questa coltura. La rimozione delle piante infestanti si realizza prevalentemente a mano utilizzando come attrezzo le zappette, senza ricorrere alle sarchiatrici meccaniche. Per quanto riguarda la fioritura, nonostante i panorami offerti da questi splendidi fiori, gli steli fiorali devono essere preventivamente eliminati in modo da convogliare nei rizomi una maggiore quantità di iridali, ed eventualmente comunque buona norma eliminare gli steli ormai sfioriti, staccandoli direttamente alla base. Foglie ed intere piante disseccate o ammuffite vanno eliminate ed allontanate perché potenziali veicoli di malattie fungine e spesso sede di uova di afidi. Non sono necessari particolari trattamenti anti-crittogamici se non in casi eccezionali. La tecnica più utilizzata, per la concimazione, è quella che prevede di cospargere il terreno con concimi minerali a lenta cessione con alti titoli in fosforo e potassio, sono infatti molto utilizzati il perfosfato d'ossa, il solfato di potassio e il solfato d'ammonio. Si effettuano generalmente due interventi, uno ad inizio autunno e l'altro ad inizio primavera.

Raccolta dei rizomi

La raccolta dei rizomi viene realizzata manualmente non prima della fine del terzo anno di coltivazione. La coltura può protrarsi fino a 4 anni se la disponibilità di mano d'opera è ridotta, il suo costo è molto elevato e i prezzi del prodotto sul mercato sono modesti. I rizomi vengono raccolti da metà luglio a metà settembre, quando le piante sono in succhio. La fase di raccolta è sempre seguita dalla fase di produzione delle barbatelle. In particolare, le barbatelle vengono separate dal rizoma, lasciate asciugare al sole per qualche ora e poi sono ammucchiate ai margini del campo oppure riunite in mazzi per la conservazione in un luogo asciutto. Il materiale che non è stato usato per la produzione delle barbatelle viene lavato, in modo da eliminare il residuo terroso. Da questo momento i rizomi possono

essere sottoposti a due diversi processi di lavorazione: la sbucciatura o l'affettatura.

La mondatura e l'affettatura

La **mondatura**, detta anche sbucciatura è un'operazione che prevede la completa eliminazione dello strato più esterno del rizoma, che risulta di consistenza più dura e coriacea, in questo modo i rizomi sono privati della buccia, dei residui delle radici e di ogni altra parte che può macchiare il prodotto. Quest'operazione è eseguita con un piccolo coltello a forma di roncola (**Figura 1.6**) ed è facilitata dal passaggio dei rizomi in una betoniera riempita ad acqua in modo da eseguire una pulizia preliminare.



Figura 1.6: “Roncole” utensili tipici per la sbucciatura dei rizomi (www.profumeriepep.it)

I rizomi mondati, le cosiddette “gallozze”, sono di nuovo lavati e lasciati essiccare al sole su delle reti o delle stuoie per 6 – 10 giorni. Tramite la mondatura si ricava il più pregiato rizoma di tipo bianco (**Figura 1.7**).



Figura 1.7: Rizomi mondati di *I. pallida* Lam. per la produzione di rizomi bianchi (www.toscanagiaggiolo.it)

L'**affettatura**, viene eseguita con le tradizionali affetta tuberì, mostrata in **Figura 1.8**. Anche i rizomi affettati sono lasciati essiccare al sole come nel caso dei bianchi. Da questi si ottiene la produzione dei rizomi di tipo nero destinati all'industria profumiera. Diverse sono le ragioni che fanno decidere la quantità di rizoma da destinare all'uno o all'altro processo anche se le più rilevanti sono associate alle richieste di mercato e alla disponibilità di manodopera. Le quantità prodotte di nero sono superiori rispetto a quelle di bianco, la ragione principale è da ricercarsi nelle tempistiche di lavorazione e nei costi della manodopera, inferiori nel caso dell'affettatura rispetto alla mondatura. Quando i rizomi (bianchi e neri) sono secchi, sono ammucchiati in locali asciutti e freschi. La loro conservazione si protrae per 3-4 anni, fino al momento in cui si ha la completa trasformazione degli iridali in ironi.



Figura 1.8: Introduzione dei rizomi nel macchinario per l'affettatura (www.mauriziovernini.wordpress.com)

Estrazione degli oli essenziali

Gli ironi sono estratti dai rizomi per distillazione oppure per estrazione con solventi.

Nel primo caso vengono utilizzati i rizomi bianchi, preventivamente ridotti in polvere. Prima di essere sottoposta a distillazione con vapore d'acqua, la polvere di rizoma deve essere trattata con acido solforico (H_2SO_4) per 12 ore. Questo trattamento ha l'obiettivo di degradare l'amido in zuccheri semplici, poiché l'amido sottoposto a distillazione forma delle strutture solide, che difficilmente possono essere degradate. In seguito alla distillazione vera e propria si ottiene un olio essenziale chiamato "concreta" o "burro d'*Iris*", solido a T° ambiente poiché ha un punto di fusione intorno ai 45°-50° C. La consistenza del "burro d'*Iris*" è dovuta al grado di saturazione degli acidi grassi presenti ed

in generale alla presenza dell'acido miristico. Il burro viene in seguito sospeso in acqua e trattato con NaOH per 48 ore. Dopo questo trattamento, gli acidi grassi vengono allontanati e si esegue un'ulteriore distillazione tramite la quale si ottiene l'essenza fluida o “assoluta”, conosciuta anche come “essenza d'Iris” che contiene il 60-80% di ironi. Tale sostanza in alcuni periodi arriva ad avere un valore di cinquantamila euro al chilogrammo.

Il processo di estrazione tramite solventi è applicato di solito ai rizomi affettati. Da questo processo si ricava il “*condensato d'Iris*”, una sostanza che ha un colore che varia dal giallo chiaro al bruno e che contiene fino al 20% d'ironi. Uno degli studi che ha permesso l'elaborazione dei moderni sistemi di estrazione e produzione degli ironi è stato compiuto da Krick et al. nel 1984. Essi avevano dimostrato che i precursori degli ironi sono gli iridali. È stato scoperto che il processo di conversione può avvenire sia attraverso reazioni chimiche (ossidazioni) che tramite un processo microbiologico. Esistono dei metodi di velocizzazione del processo, molto interessanti, non solo perché permettono di ottenere maggiore quantità e qualità di prodotto, ma anche perché permettono di superare il vincolo dei 3-4 anni di stagionatura, che come detto è il periodo in cui gli iridali, vengono convertiti in ironi, i composti di nostro interesse. Nella fattispecie da colture *in vitro* di espianti di rizoma, risultate contaminate, furono isolati, da Belcour et al. nel 1993 due ceppi di batteri, uno di colore bianco, *Serratia liquefaciens* (*Enterobacteriaceae*) e l'altro giallo *Pseudomonas maltophilia* (*Pseudomonadaceae*). Per determinare l'attività di questi due batteri, i due ceppi furono inoculati su rizomi precedentemente autoclavati, per cui sterili, per otto giorni. Entrambi i ceppi erano in grado di produrre ironi, ma *Serratia liquefaciens* sembrava essere il ceppo più efficiente nella sintesi degli ironi. Questo trattamento batterico dei rizomi di giaggiolo risulta essere migliore dei tradizionali metodi in termini quantitativi. Nel dettaglio dopo otto giorni d'incubazione dei rizomi con il batterio sono stati ottenuti 800 mg di ironi per kg di rizoma, mentre il contenuto degli ironi in rizomi giaggiolo stagionati per tre anni era pari a 400 mg/kg (Florio, 2013).

Avversità

Se piantato correttamente in un terreno sano, ben esposto e ben drenato, il giaggiolo è una pianta forte e piuttosto resistente alle comuni malattie. Le più frequenti e quindi da inquadrare come più dannose le seguenti malattie batteriche e fungine:

- il marciume del rizoma che si manifesta in ambiente caldo – umidi,
è provocato dallo *Pseudomonas iridis*, dal *Bacillus omnivorus*, dal *Bacterium*

carotovorum Jones e dal *Bacterium iridis*;

- la ruggine che forma sulle foglie macchie giallastre allungate sulle quali appaiono, in un secondo momento, le pustole rugginose della *Puccinia iridis*;
- l'imbrunimento delle foglie causato dalla *Septoria iridis* che provoca la formazione di piccole macchie ellittiche orlate di bruno che si allargano in poco tempo fino a coprire tutta la foglia, la malattia colpisce soprattutto le colture troppo fitte o concimate con sostanze organiche troppo abbondanti;
- il seccume, dovuto a *Heterosporium gracile*, che si manifesta nelle annate umide, con macchie oblunghe di color scuro successivamente orlate di bianco che si espandono e confluiscono fino a far seccare l'intera foglia;
- il mal vinato o "ribollimento" che è dovuto alla *Rhizoctonia Violacea* Tul. e, che pur provocando il marciume dei rizomi, lascia le foglie non deperite;

Tra gli insetti gli unici a creare danni sono: le mosche degli *Iris* o *Eumerus strigatus* Fall. la cui larva si sviluppa e si ciba all'interno del rizoma; gli afidi, *Aphisiridis* o "Pidocchio farinoso".

2.3 Propagazione

La riproduzione dell'*Iris*

La riproduzione gamica (sessuata) prevede la fecondazione ovvero la fusione di due corredi cromosomici, attraverso la formazione e al successivo incontro dei gameti maschili e femminili derivanti da piante diverse nel caso di fecondazione incrociata (allogamia) o dal medesimo individuo nell'autofecondazione (autogamia).

La ricorrenza dell'autogamia nell'*Iris* può rappresentare un vincolo evolutivo in termini di rimescolamento genetico e quindi evolutivo. Il fiore d'*Iris* ha tre stami, ciascun formato da un filamento e da un'antera con due logge piene di polline. Lo stilo è formato da un tubo più o meno lungo avvolto dal tubo del perigonio, ed è diviso in cima in tre tubuli alati e lunghi, con forma e colori simili a un petalo, che terminano nello stigma. Il polline è trasportato da un fiore all'altro dagli insetti impollinatori, che sono attirati dal nettare prodotto alla base del fiore. L'insetto arriva al nettare, sfiora con il dorso gli stami guidato dal colore, dalla cresta o dalla vistosa barba e dalla striscia di papille che sono presenti sulla superficie dell'ala del fiore. Con la loro forma particolare i fiori d'*Iris* favoriscono la fecondazione incrociata. Quando un insetto ricoperto di polline esce dal fiore, non tocca la parte ricettiva dello stigma di quel fiore, perciò non lo impollina; successivamente per introdursi in un altro fiore l'insetto è costretto a strofinare il dorso sulla parete ricettiva dello stigma di un nuovo fiore, che in questo modo è fecondato dal polline trasportato dall'insetto. A questo punto il polline entra dallo stigma e penetra lo stilo fino a raggiungere gli ovuli da fecondare. L'autofecondazione viene anche impedita dai diversi tempi di maturazione degli stami e degli stigmi fenomeno che prende il nome di "dicogamia". Questi meccanismi permettono di superare le derive geniche in piante ermafrodite come il giaggiolo.

La propagazione agamica non prevede un'unione tra corredi cromosomici diversi e ciò fa sì che il nuovo individuo sia identico alla pianta madre (stesso patrimonio genetico) cioè si tratta di un clone. La propagazione agamica se da un lato permette la propagazione in tempi minori e con assoluta identità tra pianta madre e figlia, dall'altro limita fortemente il rimescolamento genetico. Oggi la moltiplicazione vegetativa è molto utile ai vivaisti e agli ibridatori per diffondere tutte quelle specie che presentano delle caratteristiche particolarmente apprezzate dal mercato. Le tecniche di propagazione vegetativa sfruttate commercialmente sono diverse: Talea, Margotta, Propaggine, Innesto, Divisione e Micropropagazione. Esse non possono essere applicate indistintamente a tutti i vegetali per

questioni di tipo fisiologico, logistico ed economico.

Tra le tecniche citate la divisione è quella più utilizzata per la moltiplicazione dell'*Iris*; essa si realizza utilizzando la parte sotterranea della pianta, come i rizomi, i bulbi o i cormi che sono divisi e ripiantati per dare nuovi individui. Da ogni pianta madre possono essere ottenuti dai due a un massimo di dieci nuovi individui, secondo la specie e il tipo di organo sotterraneo utilizzato. Questo tipo di moltiplicazione richiede tempi lunghi per la produzione di adeguate quantità di materiale utilizzabile per la moltiplicazione.

Un'altra tecnica di propagazione vegetativa, che ben si presta *all'Iris*, è la micropropagazione o propagazione *in vitro*. Essa prevede la coltura di *micro-piante*, ottenute da espianti prelevati da piante madri in condizioni di asepsi. La tecnica della propagazione *in vitro* di specie vegetali offre numerosi vantaggi:

- una rapida propagazione clonale;
- condizioni di sviluppo controllate;
- ottenimento di piante esenti da patogeni e risanamento di materiale infetto;
- una lunga conservazione del germoplasma;
- il miglioramento genetico;
- la produzione di sostanze utili da piante di particolare valore;
- una maggiore competitività sul mercato.

Esistono però anche degli svantaggi quali:

- alti costi di produzione;
- necessità di personale qualificato e specializzato;
- variabilità somaclonale quindi rischi di ottenere variazioni genetiche non controllabili nel materiale di propagazione;

La propagazione dall'*Iris pallida* Lam.

Gli impianti di giaggiolo si realizzano tramite trapianto di barbatelle ottenute per divisione dei rizomi delle piante madri. Da una pianta madre è possibile ottenere dalle 2 alle 10 barbatelle (**Figura 2.2**). I rizomi non richiedono particolari cure se non nel caso in cui trascorra molto tempo tra la raccolta dei rizomi e il trapianto. Come spesso accade, il materiale di propagazione può andare incontro a perdita di turgore. In questo caso è utile

mettere i rizomi a contatto con l'acqua, ad esempio in vasche a fondo piano con circa 1 cm di acqua al buio per 2 -3 giorni, alla fine di questo periodo i rizomi, ben imbibiti, mostreranno nuove radici di colore bianco.



Figura 2.2:Barbatella di *I. pallida*. (www.toscanagiaggiolo.it)

Prima di effettuare il trapianto e buona norma farli asciugare per un paio di ore e cospargerli di polvere di carbone di legno o zolfo. Fatto ciò è possibile porre i rizomi a dimora. La divisione dei rizomi è probabilmente una delle attività più impegnative di cui necessitano gli *Iris*. Essa si realizza tramite l'asportazione dal terreno dell'intera pianta. E' chiaro che quanto più stretto è il sesto d'impianto tanto più complessa risulterà questa attività. Una volta tirata fuori la pianta dal terreno, possono essere manipolati i rizomi, in particolare questi vengono tagliati in pezzi di varie dimensioni. Nel caso in cui i rizomi rappresentano l'oggetto della coltura, questi verranno conservati ad eccezione delle parti più esterne che risultano più vigorosi e reattivi e per ciò adatte al reimpianto (produzione barbatelle). Nel caso si avesse necessità di impiantare una maggiore quantità di piante, si deve tener conto che le parti centrali dei rizomi sono in grado di fornire piante, anche se privi di gemme, ma solo per un anno, infatti dal secondo anno in poi si ha un declino che inizia con la mancata fioritura. La divisione dei rizomi va effettuata ogni 3 anni. Questa però è un'informazione relativa, in quanto varietà, terreno e clima possono far variare l'epoca in cui diviene necessaria la divisione. In alcuni casi la divisione può essere realizzata ogni 4-5 anni in altri ogni 2.

La piantagione del giaggiolo richiede un notevole dispendio di manodopera, infatti,

assorbe circa il 20% del lavoro complessivo di richiesto dalla coltura ed è, a tutt'oggi, difficile prevedere una sua meccanizzazione (Landi e Nicoletti 1997).

Come detto la riproduzione si realizza prevalentemente per via vegetativa tramite barbatelle ovvero una parte di rizoma con foglie e qualche radice. La prima attività da compiere è quella che ci permetterà di rendere il terreno adatto ad accogliere il materiale di moltiplicazione. Se il terreno è molto secco, è necessario innaffiarlo fino ad ottenere uno strato leggermente umido. Si apre una buca non molto profonda, di circa 10 cm, e si distribuisce sul fondo una manciata di perfosfato d'ossa e una di cenere di legno, in modo da rendere il fosforo facilmente disponibile alle radici (le radici non sono in grado di accrescersi radialmente). Se possibile è utile rimescolare il terreno per incorporare bene i concimi. La seconda attività consiste, laddove non fosse già stata praticata, nel tagliare a ventaglio le foglie residue presenti sul rizoma dopo la divisione. Fatto ciò è possibile iniziare il trapianto vero e proprio delle barbatelle, realizzato completamente a mano. È importante far aderire bene il rizoma al terreno sottostante e sistemare le radici presenti in modo radiale, facendo attenzione di non lasciare bolle d'aria, spesso causa di marciumi. I rizomi vanno ricoperti di terra, ma non interamente in quanto la parte dorsale deve rimanere affiorante. Dopo il trapianto è buona abitudine innaffiare abbondantemente per i primi 3-4 giorni, al termine dei quali, salvo particolari casi di siccità non è utile irrigare. L'epoca migliore per effettuare queste attività (divisione e trapianto) si ha quando la pianta è in riposo vegetativo, cioè quando non ha ancora emesso le nuove radici. Generalmente questo periodo va dalla prima metà di Luglio fino alla fine del mese.

I rizomi raccolti possono essere conservati e piantati fino a Settembre. Nei casi in cui il trapianto venisse effettuato nei mesi successivi sarà necessario adottare alcuni accorgimenti. Se i rizomi hanno già emesso le nuove radici, questi dovranno essere trattati con particolari accortezze, come ad esempio l'uso di sabbia nell'attività di trapianto e irrigazioni più prolungate. Generalmente, nei casi di trapianto ritardato, non si verifica la fioritura nel primo anno. Nel caso di trapianti ritardati può essere sfruttata la tecnica della coltura in vaso, che permette di anticipare o ritardare le fioriture. Questa tecnica prevede l'interramento dei rizomi in vasi colmi di terra, nel periodo che va tra Febbraio e Marzo. Dopo alcune settimane è possibile trapiantare il rizoma insieme al panetto di terra che ad esso rimane attaccato. A seconda degli obiettivi prefissati dovranno essere realizzati impianti diversi. Ad esempio, per uso ornamentale risulta utile fare degli impianti piuttosto stretti, in modo da ottenere in breve tempo dei gruppi folti.



Figura 2.3: Coltivazione di *I. pallida* tra le viti. (gustarviaggiando.civico20.it)

Le distanze più frequentemente usate e riportate in bibliografia sono: 50 cm per giaggioli *alti*, 30 cm per gli *intermedi* e 15-20 cm per i *nani*. La distanza tra pianta e pianta varia anche in funzione della zona: in Toscana sono disposte tradizionalmente equidistanti tra le file (15-20 cm) e ogni fila dista 25-35 cm dall'altra, oppure tra i filari dei vigneti, riportato in **Figura 2.3** (Bezzi A., Aiello N., 1997), nel veronese si collocano a intervalli di 15 cm l'una dall'altra su file distanti 70 cm, risultato ottimale per questa coltura. Per realizzare una coltura di giaggiolo seguendo questo sesto d'impianto sono necessarie circa 90.000 barbatelle. La necessità di sestri più ampi è legata non solo alla possibilità di maggiore sviluppo dei rizomi, ma anche maggiore facilità nelle attività di divisione. Spesso nelle zone di coltivazione italiane il giaggiolo è posto nell'interfilare di vigneti e uliveti, fornendo meravigliosi scenari. Le rese annue in kg di rizomi prodotti si aggirano intorno a 6-8 t/ha mostrando un'elevata variabilità di anno in anno (Landi e Nicoletti 1997).

Problematiche

Il metodo di propagazione dell'*I. pallida* ha notevoli ripercussioni sulla possibilità di sviluppo di questa coltura. Ad esempio il fatto che gli impianti di giaggiolo si realizzano

tramite trapianto di barbatelle ottenute per divisione dei rizomi di piante madri determina due grossi problemi: (i) parte del materiale che potrebbe esser destinato alla vendita deve essere utilizzato per la propagazione; (ii) solamente le aziende che coltivano il giaggiolo da molte generazioni hanno sufficiente materiale di propagazione. Come se ciò non bastasse, da una pianta madre è possibile ottenere dalle 2 alle 10 barbatelle all'anno. Un tasso di moltiplicazione così limitante impedisce alle aziende leader di aumentare le produzioni, nonostante la volontà di investimento.

Innovazione

La divisione dei rizomi è probabilmente una delle attività più impegnative ed onerose di cui necessitano gli *Iris*. La possibilità di adeguati investimenti legati alla crescente domanda di rizomi ha permesso di attuare un'analisi del mercato del giaggiolo toscano svolto dal team della Prof.ssa Silvia Scaramuzzi dell'Università di Firenze ed uno studio sulla possibilità di propagazione via embriogenesi somatica (micropropagazione) svolto dal team guidato dalla Dr.ssa Beatrice Pezzarossa del CNR-Ise di Pisa e dal Prof. Fernando Malorgio e dalla Dott.ssa Mariella Lucchesini dell'Università di Pisa e dalla Prof.ssa Mensuali della Scuola Superiore Sant'Anna. Lo sviluppo della micropropagazione dell'*I. pallida* si pone come obiettivi quelli di fornire uno strumento efficace ed economicamente vantaggioso per le aziende leader in questo settore.

CAP.3. LE COLTURE *IN VITRO*

Culture *in vitro* e micropropagazione

La coltura di tessuti vegetali si basa sulla capacità delle cellule vegetali di svilupparsi, dividersi, riorganizzarsi e dare origine a nuove piante complete. Questa capacità fu indicata da Steward con il termine di totipotenza (1968). Per micropropagazione o propagazione *in vitro* si intende l'uso delle colture *in vitro* per la propagazione vegetativa di specie vegetali in forma miniaturizzata, in condizioni controllate di illuminazione, temperature e di asepsi). I primi successi nel settore della micropropagazione furono raggiunti da Gottlieb Haberlandt alla fine del XX secolo quando annunciò la coltura di tessuti del mesofillo fogliare e del capillizio radicale. Grazie alla scoperta della vitamina B e delle Auxine, indispensabili per la crescita dei tessuti vegetali, fu possibile dagli anni 30 in poi compiere enormi progressi nello studio della coltura *in vitro* dei tessuti vegetali; furono coltivati non solo apici radicali e caulinari, ma anche apici meristematici e embrioni. Agli inizi degli anni 60' Murashige, durante il periodo di ricerca presso il laboratorio di Skoog, ideò un mezzo di coltura, originariamente composto per ottimizzare lo sviluppo di callo di tabacco, sul quale era possibile propagare un grande numero di specie vegetali differenti. Oggi il mezzo è ampiamente usato nei laboratori di tutto il mondo ed è conosciuto come MS. In Italia, la micropropagazione fu introdotta negli anni '60, quando in Liguria alcuni laboratori iniziarono un'attività di coltura *in vitro* basata sulla proliferazione meristematica di garofano e sulla moltiplicazione per proto-cormi di orchidee. L'ultima "Indagine sulla micropropagazione in Italia (Lambardi et al.2011) ha censito 23 laboratori commerciali e 46 laboratori di ricerca, presenti sul territorio nazionale, ed ha stimato la produzione annua in circa 29 milioni di piantine. È stata confermata una prevalenza nella micropropagazione dei fruttiferi (varietà e portainnesti) rispetto agli orticoli, ma è stata riscontrata una maggiore offerta rispetto al passato in termini varietali e qualitativi.

La crescita e lo sviluppo degli espianti *in vitro* sono il risultato del loro patrimonio genetico, dell'ambiente circostante e della composizione del mezzo di coltura; tra questi fattori, quest'ultimo, è il più semplice da manipolare al fine di raggiungere gli obiettivi prefissati. I mezzi di coltura sono costituiti per il 95% da acqua con addizioni variabili di sali minerali, vitamine, zuccheri e fitoregolatori. Fondamentali questi ultimi poiché in funzione della concentrazione e del tipo di ormone utilizzato il tessuto vegetale cresce in maniera differenziale. Le principali categorie di fitoregolatori sono:

- 1) le auxine (acido indolacetico, IAA, acido indolbutirrico, IBA; acido naftalenacetico, NAA; acido 2,4 diclorofenossiacetico 2,4D), in grado di far differenziare le radici avventizie, di indurre la formazione del callo e l'embriogenesi somatica;
- 2) le citochinine (chinetina; 2-isopentenil-adenina, 2iP; zeatina; benzil-amino purina, BAP; Thidiazuron) esse regolano numerosi processi morfogenetici: in generale è infatti impiegata per indurre la divisione cellulare e la produzione di germogli avventizi e/o ascellari. Al contrario delle auxine, inibiscono la radicazione;
- 3) le gibberelline, che favoriscono la distensione cellulare, l'allungamento degli internodi e la crescita degli apici gemmari.

Nel processo di micropropagazione distinguiamo le seguenti fasi:

1. induzione e stabilizzazione delle colture in ambiente asettico;
2. promozione dell'attività rigenerativa e moltiplicazione dei nuovi germogli;
3. induzione e sviluppo di nuove radici alla base dei germogli;
4. trapianto ed acclimatazione.

La micropropagazione ha inizio con la selezione del materiale vegetale che deve essere propagato. La scelta e la pulizia dei materiali vegetali di partenza sono importanti per la produzione di piante sane. Spesso le piante sono testate al fine di garantirne il livello sanitario, cioè l'esenzione da virus, funghi e batteri contaminanti. Gli espianti principalmente utilizzati per la coltura *in vitro* si possono classificare in due categorie:

- nella prima, vengono raggruppati gli espianti che contengono strutture meristematiche preformate come apici, germogli e nodi.
- nella seconda vengono raggruppati gli espianti costituiti da tessuti differenziati come porzioni di foglie, di stelo, di radici o di fiori.

Nella prima categoria raramente le piante ottenute non sono geneticamente identiche all'originale, nella seconda categoria si possono verificare con maggior frequenza mutazioni (variabilità somaclonale) soprattutto quando le piante provengono da callo (cellule indifferenziate). L'affinamento delle tecniche di micropropagazione ha permesso di mettere in piedi metodi e protocolli che rendono possibile lo sfruttamento economico di tale tecnologia. I principali vantaggi della micropropagazione consistono nella possibilità di produrre in tempi brevi, in spazi limitati e controllati, grandi quantità di materiale omogeneo (CLONI) che conserva le caratteristiche genetiche delle piante madri. Le piantine inoltre possono essere riprodotte con continuità lungo tutti i mesi dell'anno,

svincolando i laboratori commerciali dalla stagionalità tradizionale della propagazione per talea o per innesto. Con la coltura *in vitro* inoltre, è possibile pervenire a un risanamento del materiale di base e alla conservazione nei cicli di moltiplicazione successivi delle caratteristiche sanitarie di quest'ultimo. Grazie a questa tecnica si è inoltre, in grado di moltiplicare piante difficili da propagare con i metodi tradizionali.

La coltura *in vitro* rappresenta pertanto un potente strumento al servizio del vivaismo in termini di certificazione genetico-sanitaria. Oltre a rappresentare una tecnica di moltiplicazione altamente efficiente, il *vitro* rappresenta anche un'importante strumento per la conservazione della biodiversità, la valorizzazione delle produzioni e la protezione del territorio. Un'importante applicazione della micropropagazione è l'uso di micro-gemme per la crioconservazione, tecnica innovativa per contenere la perdita di risorse genetiche. Lo stoccaggio di gemme, meristemi, semi interi o embrioni, alla temperatura dell'azoto liquido (-196°C), permette il mantenimento del materiale vegetale in assoluta sicurezza genetico-sanitaria e per tempi praticamente illimitati. La micropropagazione potrebbe essere anche impiegata per la riproduzione di piante medicinali, per la produzione di biomasse o di piante micorizzate, con il duplice obiettivo di proteggere il territorio e di integrare il reddito.

Le principali tecniche per coltivare *in vitro* i tessuti vegetali possono essere così riassunte:

1. Crescita e sviluppo di meristemi preformati (meristemi apicali, apici caulinari, gemme ascellari)
2. Rigenerazione avventizia di nuovi individui da tessuti differenziati
3. Embriogenesi somatica
4. Colture cellulari (produzione di metaboliti secondari)
5. Colture di protoplasti (Ibridazione somatica/ fusione di protoplasti)

Tra queste tecniche, l'embriogenesi somatica è quella utilizzata nel caso specifico dell'*I. pallida* pertanto è esaminata in dettaglio.

3.1 Embriogenesi somatica

L'embriogenesi somatica è uno dei processi di rigenerazione delle piante con maggiori potenzialità. Questo modello rigenerativo si basa sulla formazione di strutture

fisiologicamente molto simili a quelle di un embrione zigotico, il quale si forma per fusione gametica. Gli embrioni somatici invece non derivano da fusione gametica ma bensì da cellule somatiche che acquisiscono competenza polare. A conferma della totale totipotenza posseduta dalla cellule vegetali c'è il fatto che cellule già differenziate, possono essere in grado di regredire in termini di differenziazione cioè attuare un processo di “de-differenziazione”. Tale processo in alcuni casi porta alla formazione di un tessuto indifferenziato, che prende il generico nome di callo. Se tale massa di cellule indifferenziate viene in opportune condizioni ambientali e a contatto con particolari ormoni, è in grado di formare embrioni che non derivando dalla fusione di gameti sono cloni della pianta madre. Rispetto ad altre tecniche di micropropagazione l'embrionogenesi somatica presenta alcuni svantaggi che ne limitano i campi di applicabilità: (i) l'assenza di sincronia dovuta alla difficoltà di rendere uniforme e contemporaneo il processo di sviluppo di tutti gli embrioni, (ii) l'insorgenza di mutazioni genetiche, un fenomeno osservabile soprattutto nell'embrionogenesi indiretta da masse callose, accentuato dalla presenza nel terreno di coltura di sostanze ad azione mutagena come ad esempio il 2,4 D (Barcaccia, G., & Falcinelli, M. 2006).

Ontogenesi dell'embrionogenesi somatica e differenze tra embrionogenesi somatica e zigotica

Durante il corso dell'evoluzione molte specie vegetali hanno sviluppato diverse strategie, compresa l'embrionogenesi somatica, per moltiplicarsi per via agamica con lo scopo di superare fattori ambientali e genetici che impediscono la fertilizzazione.

È stato dimostrato che l'ontogenesi degli embrioni somatici segue lo stesso percorso di quella degli embrioni zigotici e che eventuali differenze tra embrioni allo stato maturo sono imputabili soltanto alle differenze esistenti tra l'ambiente di coltura *in vitro* e quello di sviluppo *in vivo*. Quando gli embrioni zigotici vengono prelevati precocemente da un seme e sono fatti sviluppare in un terreno di coltura artificiale presentano le stesse anomalie morfologiche degli embrioni somatici probabilmente anche a causa dell'assenza totale di influenza nel loro sviluppo da parte dei tegumenti seminali. L'embrionogenesi somatica prevede una fase di induzione seguita da una fase di differenziazione, come nell'organogenesi, con la differenza fondamentale dell'acquisizione immediata di polarità da parte della cellula precursore.

L'embrionogenesi zigotica ha inizio da una singola cellula polarizzata, e successivamente da una divisione asimmetrica di questa. Come risultato di queste divisioni asimmetriche, le cellule figlie ereditano diversi fattori determinanti citoplasmatici e in tal modo acquistano destini diversi. In termini generali, l'istituzione del destino delle cellule durante lo sviluppo embrionale coinvolge l'attività localizzata di specifiche proteine regolatrici, che è il risultato dell'espressione localizzata di particolari geni (LindseyK. e Topping, JF., 1993). Le fasi di sviluppo dell'embrione somatico sono simili a quelle dell'embrione zigotico: stadio a cuore e torpedo nelle dicotiledoni mentre nelle monocotiledoni è possibile osservare gli stadi globulare, triangolare, scutellare e di formazione dei coleoptili (Figura3.1).

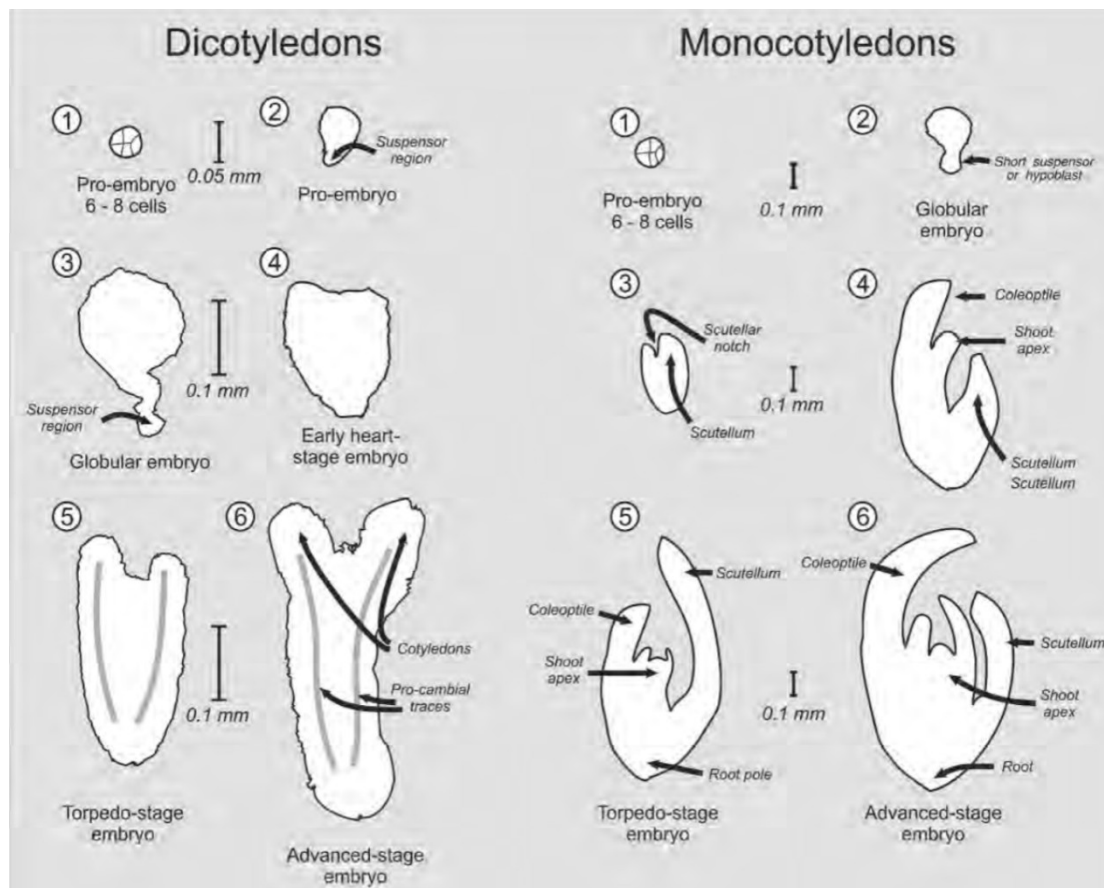


Figura 3.1: Sviluppo embrionale nelle monocotiledoni e dicotiledoni. Plant Propagation by tissue culture George E.F (2008).

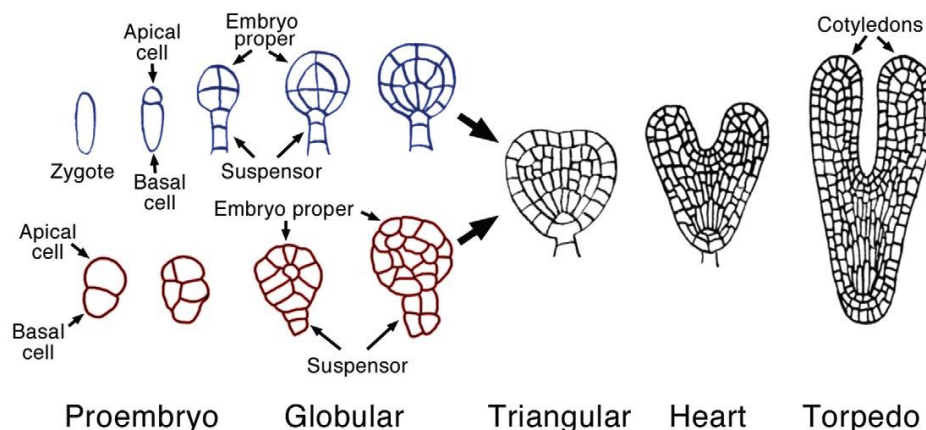


Figura 3.2:Embriogenesi Somatica (sotto) e Zigotica (sopra); von Arnold et al.(2002)

In entrambi i casi è presente il **sospensorio**, ovvero una struttura effimera, posizionata alla terminazione radicale dell'embrione. Esso raggiunge la massima importanza tra la fase globulare e quella cuore (**Figura 3.2**). Ciò è stato provato da Cionini et al. (1976) il quale osservò che in embrioni di *Phaseolus coccineus*, l'assenza del sospensore causava la morte degli embrioni quando questi venivano prelevati nello stadio globulare.

Gli embrioni somatici maturi assomigliano agli embrioni zigotici morfologicamente e fisiologicamente (Zimmerman, 1993; von Arnold et al., 2002). Entrambi presentano una polarità apicale-basale che si esplicita con la formazione del meristema apicale (formazione del germoglio) e del meristema basale (formazione della radichetta). I geni chiave che controllano l'embrione zigotico sono gli stessi che vengono coinvolti nel processo di embriogenesi somatica (Mordhorst et al., 2002).

La principale differenza fra embrione zigotico e somatico sta nell'assenza di fecondazione, tanto che gli individui ottenuti attraverso l'ES sono detti cloni, mentre quelli che derivano dallo zigote posseggono la variabilità dovute alla fusione di gameti provenienti da individui differenti, nel caso delle specie allogame, e agli eventi meiotici nel caso delle specie autogame. A livello tecnologico, una delle principali differenze sta nell'assenza della fase di dormienza. Gli embrioni somatici non possono essere essiccati, nonostante tale fase sia biologicamente fondamentale, a causa dell'assenza dei tegumenti. Il processo di embriogenesi zigotica termina con la disidratazione dell'embrione in modo da essere pronto ad attraversare fasi più o meno lunghe di quiescenza. Nell'embriogenesi somatica, o comunque *in vitro*, frequentemente gli embrioni anziché completare lo sviluppo e disidratarsi, deviano verso una germinazione precoce. Il normale decorso della

maturazione può essere ristabilito attraverso trattamenti con acido abscissico (ABA). Gli embrioni disidratati artificialmente, per mezzo di composti osmoticamente attivi, possono essere destinati alla crioconservazione oppure incapsulati al fine di ottenere semi sintetici.

L'embriogenesi somatica, prende inizio da strutture multicellulari globulari. In particolare, le cellule originarie nell'embriogenesi somatica, sono molto piccole e con citoplasma denso e in attiva divisione. Eventi induttivi agiscono sugli espianti in coltura e possono indirizzare cellule somatiche a divenire cellule embriogeniche determinate IEDC (Induced-Embryogenic Determinated Cell che, a seguito di un netto cambiamento nel loro programma di sviluppo, iniziano a moltiplicarsi come cellule indeterminate portando alla formazione di callo indifferenziato(embriogenesi indiretta). Il callo embriogenico è composto da Masse Pro Embriogeniche (PEMs). In realtà ancora non è chiaro se le prime PEM a formarsi sono in realtà un embrione somatico proveniente dal processo di embriogenesi diretta che devia dal normale sviluppo e che prolifera in risposta ai fitoregolatori. L'embriogenesi somatica è un processo rigenerativo a stadi multipli che inizia con la formazione delle PEMs. All'interno di tali masse una o più cellule avviano il processo di formazione dell'embrione e all'organizzazione degli apici meristematici, dopo di che si succedono nel tempo, la maturazione, essiccazione e la formazione della pianta. Per eseguire in modo efficiente questo percorso, dovrebbe essere applicata nei tempi giusti una determinata sequenza di trattamenti fisici e chimici (von Arnold et al. 2002). Il processo di embriogenesi somatica è composto da 5 fasi. La prima fase comporta una crescita isodiametrica dell'aggregato di cellule ed è caratterizzata da una proliferazione non orientata che, mediante successive divisioni mitotiche, che porta alla formazione di un **aggregato globulare** non polarizzato (fase 1). Tale struttura si organizza attraverso una prima fase di differenziazione, formando una struttura polarizzata cosiddetta a sfera (fase 2). L'acquisizione della polarità determina la formazione dei poli, ovvero l'organizzazione dell'apice caulinare e dell'apice radicale. La terza fase implica sia una progressione della polarità, con un incremento dell'attività enzimatica compresa nella zona tra i due apici, sia l'organizzazione del tessuto vascolare. A questa fase appartengono due strutture: una struttura a cuore (fase 3) e una a torpedo (fase 4) che rappresenta un embrione maturo, con differenziazione completata degli apici caulinare e radicale. Attraverso l'attivazione dei meristemi, da ogni embrione somatico maturo è possibile ottenere direttamente una plantula (fase 5), processo noto come **conversione**.

Embriogenesi somatica diretta e indiretta

Come nell'organogenesi, anche l'embriogenesi somatica può avvenire per via diretta, a partire da cellule somatiche dell'espianto iniziale, oppure per via indiretta, a partire da cellule indifferenziate, cioè dal callo. Nell'embriogenesi somatica diretta, gli embrioni si originano direttamente dalle cellule del tessuto dell'espianto primario, che sono chiamate **cellule pro-embriogenetiche determinate** PEDC (Pre-Embryogenic Determined Cells), cioè cellule che hanno già acquisito la competenza per un programma di sviluppo embriogenico e che per avviarlo necessitano dell'addizione di induttori o della rimozione di una o più sostanze inibenti. Tali cellule sono generalmente caratterizzate da dimensioni ridotte forma rotondeggiante con nucleo relativamente grande, nucleolo evidente e citoplasma ricco di granuli di amido.

L'embriogenesi somatica indiretta è quella più comunemente usata; richiede una preventiva formazione di callo oltre che l'induzione all'interno di questa struttura di **cellule embriogeniche determinate** IEDC. Per questo tipo di rigenerazione è fondamentale realizzare una serie di trattamenti induttivi che portano alla differenziazione delle cellule embriogeniche e alla maturazione degli embrioni somatici riassumibili in 5 stadi:

1. Induzione dell'embriogenesi somatica, ponendo gli espianti primari su mezzi arricchiti con PGRs, quali auxine e citochinine.
2. Proliferazione delle cellule embriogeniche
3. Maturazione primaria degli embrioni, su mezzi con un ridotto o nullo contenuto in PGRs, soprattutto di auxine (che inibiscono la formazione degli embrioni)
4. Maturazione degli embrioni somatici su mezzi di coltura addizionati con acido abscissico.
5. Sviluppo completo di plantule.

L'induzione di cellule proembriogeniche e la loro successiva differenziazione è connessa alla somministrazione di sostanze ormonali, principalmente auxine. Numerose ricerche hanno infatti dimostrato che sono necessari due tipi di substrati: uno iniziale addizionato con una auxina sintetica generalmente NAA a o 2,4 D per la differenziazione di cellule embriogeniche per l'ottenimento dello stato determinato rappresentato dalle masse pro-embrionali. Il secondo mezzo di coltura, usato per lo sviluppo di queste masse e per la

maturazione degli embrioni somatici, non deve contenere auxine poiché tali fitoregolatori promuovono la proliferazione cellulare disorganizzata che risulta negativa per la differenziazione. Talvolta sono necessari piccoli apporti di citochinine (BA) mentre in altri casi la maturazione degli embrioni somatici è favorita dalla presenza di acido abscissico (ABA).

Nel processo di embriogenesi somatica hanno molta importanza sia un adeguato bilancio ormonale che la presenza di azoto (N) ridotto sotto forma di ioni ammonio e/o amminoacidi. Importante è l'influenza esercitata dalla natura dell'espianto. Embrioni somatici possono essere più facilmente indotti a partire da espianti prelevati da tessuti giovani o meristematici, cioè quei tessuti in cui il livello di differenziazione è basso. I cotiledoni rappresentano la fonte principale di tessuto embriogenico, oltre a questi l'organo dotato di maggiore competenza è il fiore, a livello delle cellule che costituiscono stami e carpelli. L'embriogenesi può comunque prendere avvio anche impiegando organi vegetativi come porzioni di foglie, piccoli apici di germogli e radici purché i loro tessuti siano giovani.

Produzione di semi sintetici

I semi somatici, chiamati comunemente semi sintetici sono gli analoghi artificiali dei semi naturali. In effetti si tratta di un processo che consiste nel costruire un involucro di alginato di calcio attorno agli embrioni somatici che ha la funzione di proteggerli dai danni meccanici durante la conservazione e la semina. Inizialmente si allestiscono soluzioni prive di calcio dove sono presenti oltre agli embrioni, nutrienti e regolatori di crescita in grado di promuovere la loro sopravvivenza e successiva germinazione. A queste soluzioni viene aggiunto alginato di sodio. Da questa sospensione vengono prelevati gli embrioni con una aliquota della soluzione e vengono trasferiti in una soluzione concentrata di CaCl_2 dove avviene il rilascio di NaCl e il legame degli ioni calcio all'alginato creando un involucro di protezione piuttosto resistente intorno all'embrione.

I vantaggi di questa tecnologia consistono nella possibilità di produrre "semi" maneggiabili con una maggiore dimestichezza rispetto agli embrioni singoli che, essendo meno suscettibili ai traumi, hanno maggiori possibilità di rimanere vitali fino alla semina e quindi alla germinazione. Inoltre le piante così ottenute possono essere destinate all'acclimatazione *ex vitro* (Fontanili et al. 2015).

I semi sintetici sono un ottimo strumento per la conservazione degli embrioni al freddo. Uno dei principali problemi dei protocolli di propagazione via embriogenesi somatica è l'assenza di dormienza che obbliga i produttori ad utilizzare nell'arco di una o due settimane gli embrioni ottenuti dalle colture di callo. La conservazione al freddo dei semi artificiali è un potente strumento per ovviare a questo problema. Attraverso un preventivo disseccamento è anche possibile destinare questi embrioni alla crioconservazione a lungo termine, ad esempio per la costituzione di banche per il germoplasma. La tecnologia dei semi sintetici può essere anche utilizzata per incapsulare altri organi, diversi dagli embrioni somatici, come le gemme e internodi.

3.2 Micropropagazione dell'*Iris* spp.

Il primo lavoro di micropropagazione svolto su individui appartenenti al genere *Iris* è stato fatto da Randolph nel 1945; esso riguardava la conservazione di embrioni zigotici. Successivamente Baruch e Quak(1966) hanno realizzato la coltura *in vitro*, degli apici meristematici per la produzione di *Iris* virus esenti. Hussey nel 1976 fece uno studio sull'*Iris hollandica*. Egli riportò l'uso di 6-benziladenina (BA) 0,5 M per rompere la dominanza apicale ed indurre la proliferazione di germogli multipli e la combinazione di BA ed acido naftalenacetico (NAA) per produrre germogli su espianti di fusto e scaglie esterne di bulbi. L'uso delle scaglie esterne dei bulbi fu utilizzato in seguito per la produzione di bulbi tramite organogenesi diretta. La tecnica fu applicata nel 1988 ad *I. hollandica* (Van der Linde et al. 1988). In seguito fu notato che la produzione di "bulbetti" subiva un incremento sostanziale in relazione all'aumento del contenuto di saccarosio (6–38%) e agar (0,6–0,8%) e mantenendo le colture in condizioni di buio e a bassa temperatura (16°C) (Mielke e Anderson 1989). Lavori dedicati in maniera specifica alla coltura di *Iris* per la produzione di ironi (molecole responsabili del profumo di viola) furono svolti agli inizi degli anni novanta. Un importante contributo è stato dato dal lavoro svolto da Para e Baratti nel 1992 su *I. sibirica*. Tale studio ha verificato che il tessuto indifferenziato era capace di accumulare i precursori dei ironi nella prima fase di coltura e di convertirli in ironi dopo 30 giorni di coltura. In seguito molti lavori sono stati effettuati su diverse varietà di *I. germanica* da Shimizu nel 1997 e Wang nel 1999, i quali ottennero embrioni da colture di cellule in sospensione. Un altro lavoro di embriogenesi somatica riguarda *I. pumila*, una specie tassonomicamente vicina a *I. pallida*. Esso descrive un protocollo di embriogenesi somatica a partire dalla base di foglie appartenenti a piantine

coltivate *in vitro*. Il callo embriogenico è stato ottenuto su un mezzo di coltura addizionato con acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4D) e kinetina (4,5 μ M). Per la formazione di embrioni è necessario utilizzare mezzi addizionati con BA (4,5 M), mentre la rigenerazione di germogli è stata ottenuta trasferendo gli embrioni su un mezzo privo di fitoregolatori. Esistono pochi lavori che riguardano in modo specifico *I. pallida* e ricalcano per alcuni versi quelli svolti per *I. germanica* ed *I. pumila*.

Questi lavori riguardano l'analisi dell'embriogenesi somatica, che si realizza attraverso l'ottenimento di "callo embriogenico", (generalmente di colore giallo nel caso del callo embriogenico dell'*I. pallida*) che posto in condizioni ambientali adatte ed adeguatamente stimolato tramite ormoni specifici è in grado di differenziare degli embrioni somatici. In seguito, modificando ancora le condizioni ambientali e il dosaggio ormonale, dagli embrioni possono essere ottenute delle plantule, che una volta acclimatate *ex vitro* possono essere trapiantate in campo dove svolgono in autonomia tutti normali processi fisiologici, compresa la fioritura o la produzione di rizomi. Gazu et al. nel 1993 hanno dimostrato che la parte basale delle foglie è in grado di generare "callo embriogenico" su un mezzo di Linsmaier e Skoog (LS) con l'aggiunta di 2,4 D (4,12 μ M) e kinetina (0,5 μ M) in condizioni di buio continuo. Una volta ottenuto il callo, questo può essere trasferito alla luce, dove andrà incontro a una parziale differenziazione di embrioni somatici che poi maturano e si differenziano in plantule una volta trasferiti sul medesimo mezzo con l'aggiunta di kinetina e acido gibberellico. Un aspetto molto importante ha riguardato la verifica della presenza di variazioni somaclonali, che sono state valutate sia dal punto di vista fenotipico che dal punto di vista chimico attraverso le analisi dei precursori di γ -ironi. I cromatogrammi dei campioni estratti dai rizomi di piante rigenerate *in vitro* paragonati con quelli di piante madri davano profili totalmente sovrapponibili, dimostrando l'assenza di variazioni che possono compromettere il valore di queste piante. Jehan et al. nel 1994 hanno definito un metodo per la rapida moltiplicazione di plantule di *I. germanica* ed *I. pallida* attraverso il metodo del callo embriogenico. Il lavoro ha preso in esame diversi tipi di espianco come ad esempio le basi delle foglie ed i bocci chiusi dei fiori, proprio questi ultimi sono risultati essere i più adatti, poiché la precocità di raccolta e la presenza dell'involucro florale permette di ottenere degli espianci non inquinati. Prelevare gli espianci da fiori immaturi, oltre ad evitare le contaminazioni, dà la possibilità di avere costantemente a disposizione questo tipo di materiale. Una strategia usata, è quella di porre i rizomi in serra alterando i tempi di fioritura, stimolando così la rifioritura durante tutto l'anno. I migliori risultati

sono stati ottenuti con *I. germanica*, nel quale la conversione degli embrioni in plantule avviene meglio che nell'*I. pallida* dove è quasi nulla. Gli espianti sono stati posti su un mezzo MS addizionato con il 5% di saccarosio, prolina ($2,9 \text{ g L}^{-1}$) e con l'aggiunta di 2,4 D e kinetina ($5 \text{ }\mu\text{M}$ entrambe) al buio. Dopo nove settimane su questo substrato sono stati ottenuti il 76 % di calli indifferenziati e il 10% di calli embriogenici. Gli embrioni aumentano se il mezzo viene spostato alla luce. Tre settimane più tardi, gli embrioni, sviluppano plantule sul medesimo mezzo addizionato con saccarosio al 25% e kinetina ($0,5 \text{ }\mu\text{M}$). Sullo stesso mezzo le plantule producevano delle rosette di germogli, probabilmente dovute alla presenza di embrioni multipli, che sono stati in seguito separati incrementando così il tasso di proliferazione. Anche in questo caso la conformità delle plantule rigenerate è stata saggiata riscontrando che i chemiotipi di queste piante e quelli delle piante dalle quali originavano, mostrano profili identici fra loro.

L'embriogenesi somatica dell'*Iris pallida*

La specie oggetto di questa sperimentazione è *I. pallida*, che insieme all'*I. germanica* rappresentano le specie che più di tutte sono in grado di accumulare i pregiati ironi. Molto è stato fatto nell'ambito del progetto territoriale "Recupero e valorizzazione della coltivazione del giaggiolo da rizoma nella zona del Pratomagno" finanziato per alcuni anni dalla Regione Toscana che ha visto coinvolti alcuni enti di ricerca (Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, dell'Università di Pisa, la Scuola Superiore Sant'Anna e il CNR, Istituto per lo Studio degli Ecosistemi), l'assessorato all'agricoltura della provincia di Arezzo (AR) e l'Associazione Toscana Giaggiolo, la cooperativa dei produttori toscani di giaggiolo. Questo studio è stato basato sull'induzione dell'embriogenesi somatica su tessuti provenienti da fiori immaturi e da frammenti di foglie di plantule sviluppate *in vitro*. I primi dati ottenuti, relativi all'inquinamento degli espianti, hanno promosso il bocciolo (fiore immaturo) come miglior candidato per i test iniziali di induzione. Oltre ad aver testato differenti tipi di espianti sono stati condotti esperimenti su mezzi d'induzione che differiscono tra loro per la tipologia e la concentrazione dei regolatori di crescita, nonché dei componenti organici. Abbiamo osservato che il mezzo di MS contenente $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ Kinetina (Kin) e 1 mg L^{-1} acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4D) è risultato essere il più idoneo. Un altro mezzo MS contenente 1 mg L^{-1} di Kin e 1 mg L^{-1} di 2,4D è risultato essere il più adatto per le sottoculture successive di callo embriogenico. Per indurre e mantenere la formazione di embrioni, è

stato utilizzato come mezzo d'espressione, un mezzo Knudson C modificato, addizionato con 1 mg L^{-1} Kin e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ acido indol-3-butirrico (IBA). Trasferendo gli embrioni ottenuti su un mezzo MS contenente $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ di 6-benziladenina (BA) e acido α -naftalenacetico (NAA), è stato possibile ottenere plantule complete *in vitro*, da destinare all'acclimatazione *ex vitro*. La possibilità di indurre la formazione di callo embriogenico su espianti di foglie (sterili e presenti tutto l'anno) ha permesso di ottimizzare il processo di produzione. È stata quindi svolta un'analisi dettagliata del ciclo di propagazione via embriogenesi somatica, da colture di callo ottenuto attraverso l'induzione di tessuti provenienti da plantule allevate *in vitro* di Giaggiolo toscano per sei subcolture al termine delle quali si verificava una drastica riduzione di capacità embriogenica del callo.

Infine sono stati prodotti dei semi artificiali, ottenuti inserendo gli embrioni somatici in capsule di alginato. Questi sono stati in grado di mantenere vitali gli embrioni e di permettere la loro conservazione per lunghi periodi. Considerando che un bocciolo potrebbe fornire una media di dodici espianti, i nostri risultati hanno dimostrato che in un ciclo della durata di sei mesi possono essere prodotte circa 150 piantine, con la possibilità di attuare altri cicli partendo dalle foglie delle plantule ottenute. Il callo ottenuto da queste foglie ha una capacità embriogenetica di circa 30 embrioni/g di callo ed una germinazione degli embrioni del 50%. Da 1 grammo di espianti fogliari prelevati dalle piante *in vitro*, è possibile ottenere in circa 60 giorni 8 g di callo embriogenico, in grado di fornire in altri 20 giorni oltre 200 embrioni e quindi circa 100 piantine da acclimatare *ex vitro*.

CAP.4. VARIABILITÀ SOMACLONALE

Fin dalla prima osservazione della presenza della variabilità somaclonale, ad opera di Braun nel 1959, essa è divenuta una delle principali problematiche delle colture *in vitro*. L'ottenimento di piante intere a partire da colture cellulari è un tipo di propagazione asessuata, ottenuta tramite processi di divisione cellulare mitotica e non meiotica. Per tale ragione, in linea teorica le cellule, e quindi gli organismi ottenuti, non dovrebbero presentare nessuna variazione. Tali individui vanno sotto il nome di cloni *true-to-type*. Contrariamente a quanto atteso si osservano talora fenomeni di variazione somatica spontanea, inattesi ed indesiderati (Karp 1994). Fanno eccezione i casi nei quali la variabilità ottenuta è sfruttata all'interno di programmi di selezione variatale. Ad esempio, questa caratteristica è stata molto usata per ottenere variazioni di caratteri poligenici (Brar and Jain 1998; Jain 2001).

Definire la variabilità

Le colture *in vitro* possono favorire l'estrinsecazione della variabilità fenotipica e genetica già presente nella pianta madre, ma non espressa *in vivo*, nonché dell'accumulo di variazioni. Questo tipo di variabilità fu definita **somaclonale** (soma = corpo, clonale = copia identica) da Larkin e Scowereft nel 1981. Per distinguere la variazione osservata nelle colture di cellule gametiche è stato coniato il termine di variazione gameto-clonale (Evans et al. 1984). Altri termini usati in questo ambito sono: callo-clonale (variazioni somaclonali ottenute su colture di callo) e proto-clonale (variazioni somaclonali ottenute su colture di protoplasti). La variabilità somaclonale si definisce pertanto come la comparsa casuale, nelle piante prodotte *in vitro*, di mutazioni genetiche irreversibili ed ereditabili a cui vanno aggiunte le variazioni epigenetiche, ovvero variazioni non geniche reversibili e non ereditabili. A causa di tale variabilità le colture *in vitro* sono spesso considerate fonte di instabilità per i genotipi che vengono propagati con queste tecniche. Tale fenomeno rappresenta un grosso limite alla micropropagazione in generale, e in modo preponderante nella propagazione clonale.

Nella variabilità somaclonale è possibile fare una distinzione tra **variabilità preesistente** *in vivo* e variabilità **indotta** dalle condizioni di coltura *in vitro*.

La **variabilità preesistente** è tipica delle specie a propagazione agamica (molte arboree la presentano) dovuta all'accumulo di mutazioni sullo stesso individuo.

La **varietà somaclonale indotta** ha una distribuzione costante tra le varie specie; tale variabilità è strettamente associata alla lunghezza del periodo che la coltura trascorre *in vitro* nella fase di callo a causa della massiccia dose di ormoni (soprattutto 2,4 D, ma anche IBA e NAA, che sono agenti mutageni). Anche la velocità di crescita della coltura, e quindi la velocità di divisione cellulare è direttamente proporzionale all'accumulo di mutazioni. È stato osservato che le mutazioni sono più frequenti nelle piante poliploidi e con un numero maggiore di cromosomi. In relazione all'espianto è stato osservato che gli espianti meristematici accumulano meno variazioni rispetto ad espianti prelevati da tessuti ben differenziati (Barcaccia, G., & Falcinelli, M. 2006). Come accennato questo fenomeno non è del tutto negativo, in alcuni casi tale variabilità può essere sfruttata nei programmi di miglioramento genetico.

Ciò che risulta di fondamentale importanza, è la capacità di valutare l'effetto che tali mutazioni possono avere nei protocolli di propagazione in modo da poter assicurare gli standard qualitativi che questa tecnologia si pone di raggiungere. Ad esempio, nei cereali, sono stati riscontrati fenomeni di mutazioni geniche (dominanti, recessive e semidominanti), amplificazioni geniche (cioè aumento del numero di copie di un dato gene), variazioni del numero cromosomico (aneuploidia e poliploidia), arrangiamenti cromosomici, mutazioni a livello di genoma mitocondriale e plasmidiale, forme di resistenze (ad antibiotici, tossine patogene, stress ambientali).

4.1 Tecniche per la valutazione delle variazioni somaclonali

Alti tassi di variazioni somaclonali nel processo di micropropagazione rappresentano un limite, soprattutto quando si cerca di effettuare operazioni commerciali su larga scala. L'applicazione di uno specifico protocollo di coltura *in vitro* per la propagazione massale di una specie richiede una attento esame che escluda la presenza significativa di variabilità somatica negli individui ottenuti. La diagnosi precoce e la preventiva eliminazione delle linee mutate è quindi fondamentale per ottimizzare i processi propagativi

Le variazioni somaclonali possono essere rilevate utilizzando varie tecniche come: la valutazione morfologica, tecniche di analisi fisiologica / biochimica, la citofluorimetria ed in fine le analisi molecolari.

Caratteri Morfologici

La valutazione dei caratteri morfologici è un'attività descrittiva che permette di mettere in evidenza variazioni di carattere fenotipico rispetto alla pianta madre o all'ecotipo di riferimento. Ad esempio, piante di banana micro propagate non conformi, possono essere rilevate visivamente durante l'acclimatazione in serra prima del trapianto in campo oppure in post trapianto attraverso l'osservazione dell'indice di area fogliare (lunghezza foglia / larghezza) (Al. Rodrigues et 1998). Allo stesso modo, in palma da dattero, la produzione di germogli avventizi, eccessiva crescita vegetativa, foglie chiare e variegate sono indicatori della presenza di variazioni somaclonali (Zaid e Al Kaabi 2003). Tuttavia, i tratti morfologici sono spesso fortemente influenzati da fattori ambientali e possono non riflettere la reale composizione genetica di una pianta. Jarret e Gawel (1995) hanno sollevato preoccupazioni circa la valutazione dell'identità somaclonale attraverso l'analisi morfologica, che può causare sottostime dell'effetto di mutazioni genetiche dovute alla manipolazione *in vitro*. Per tali ragioni le valutazioni morfologiche rappresenta un ottimo strumento in fase preliminare per la valutazione degli effetti grossolani, come ad esempio le dimensioni e il colore di specifici organi. In secondo luogo, se venissero evidenziate delle variazioni attraverso i metodi di analisi molecolare questi caratteri potrebbero essere utilizzati come marcatori.

Analisi fisiologiche/biochimiche

L'uso di esami biochimici per rilevare i varianti è più rapido rispetto alle valutazioni morfologiche poiché tali valutazioni possono essere effettuate nelle fasi giovanili, abbassando notevolmente le perdite economiche (Israele 1995). Le risposte delle piante a fattori fisiologici come la somministrazione di ormoni, la quantità di luce, e di temperatura, la capacità fotosintetica possono essere utilizzate per individuare le variazioni somaclonali (Peyvandi et al. 2009). Per esempio, somministrando l'acido gibberellico, che regola la crescita e influenza vari processi di sviluppo delle piante, si possono evidenziare delle variazioni somaclonali che determinano delle diverse risposte tra le piante "true-to-type" e le cosiddette "off-type" (Phinney 1985; Sandoval et al. 1995). Anche la sintesi di pigmenti come la clorofilla, i carotenoidi, gli antociani può essere utilizzata come base per rilevare varianti somaclonali (Shah et al. 2003). Ad esempio, Mujib (2005) ha osservato che alcune piante di ananas hanno mostrato un contenuto più basso di clorofilla, negli off-type, rispetto ai true-to-type. Analogamente, anche i carotenoidi totali variano notevolmente tra true-to-type e

variante somaclonale (Wang et al. 2007). Un ottimo test può essere svolto anche attraverso il confronto dei profili cromatografici ottenuti dall'analisi HPLC di metaboliti secondari tipici della specie in esame

Analisi Citologiche

Le variazioni della ploidia o del numero di cromosomi sono una diretta evidenza di mutazioni nel genoma di un organismo (Kunitake et al. 1995; Al-Zahim et al. 1999). Variazioni dei cromosomi, così come il contenuto di RNA e DNA sono importanti indicatori delle variazioni somaclonali (Bogdanova 2003; Nakano et al. 2006; Fiuk et al. 2010) così come gli studi cariologici delle modificazioni cromosomiche (Al-Zahim et al. 1999; Raimondi et al. 2001; Mujib et al. 2007). Tuttavia, questi metodi richiedono tempo e spesso i cromosomi sono difficili da osservare (Dolezel 1997). Come risultato, si è molto sviluppata la citometria a flusso che permette di calcolare la quantità di DNA nucleare (Dolezel et al. 2004). Tale metodologia prevede la preparazione di sospensioni acquose di nuclei intatti il cui DNA è intercalato con un fluorocromo specifico. I nuclei sono classificati in base alla loro intensità di fluorescenza ovvero, in base al loro contenuto di DNA. Poiché la preparazione del campione e le analisi sono relativamente semplici e rapide, questa tecnica è stata impiegata per valutare la stabilità della ploidia in piante come la quercia da sughero (Loureiro et al. 2005) e per l'accertamento della presenza di variazioni somaclonali in fragola (Nehra et al. 1992), banana (Giménez et al. 2001) e patata. Uno dei principali problemi di questa tecnica è l'assenza di un database di riferimento per i contenuti di DNA, ciò causa limitazioni nell'uso della citometria a flusso (Dolezel e Bartos 2005). In definitiva la tecnica citofluorimetrica fornisce dati molto generici rispetto alle tecniche molecolari basate sulla PCR (polymerase chain reaction), ma al contrario è caratterizzata da un'elevata semplicità d'impiego che la rendono utile soprattutto per la valutazione delle modificazioni su specie di interesse locale, come nel caso specifico dell'*I. pallida* Lam., per le quali non esistono marcatori saggiati né tanto meno un genoma di riferimento.

Analisi Molecolari

Nel ventennio scorso un crescente numero di tecniche di biologia molecolare basate sul meccanismo della PCR (polymerase chain reaction) sono state sviluppate come ad esempio RFLP, RAPD e AFLP ampiamente utilizzate per la valutazione delle variazioni somaclonali (Gostimsky et al. 2005). La RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism) è stata la prima ad essere applicata allo studio delle variazioni somaclonali.

Il limite di questa tecnologia sta nella necessità di utilizzare sonde per ibridare sequenze note non sempre disponibili. La RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) è una PCR in cui i segmenti di DNA amplificati sono scelti casualmente. Per eseguire una RAPD, si costruiscono un certo numero di primer brevi (8–12 nucleotidi) a composizione arbitraria e si procede alla reazione di amplificazione usando come stampo un lungo tratto di DNA genomico. Nel caso in cui i primer riescano ad associarsi al DNA, l'amplificazione produrrà una serie di frammenti che, interpretati, permetteranno di approssimare un profilo semi-individuale dell'organismo in analisi. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Polanco e Ruiz 2002) è una tecnologia che ha la capacità di individuare contemporaneamente diversi polimorfismi in differenti regioni genomiche. E' caratterizzata da elevate sensibilità e riproducibilità. Questa tecnica è largamente usata per l'identificazione di variazioni genetiche. Anche la FISH, ibridazione fluorescente in situ (Fluorescent in situ hybridization) è una tecnica citogenetica che può essere utilizzata per rilevare e localizzare la presenza o l'assenza di specifiche sequenze di DNA nei cromosomi e quindi di variazioni. Essa utilizza delle sonde a che si legano in modo estremamente selettivo ad alcune specifiche regioni del cromosoma. Per individuare il sito di legame tra sonda e cromosoma si utilizzano tecniche di microscopia a fluorescenza.

Il caso dell'*I. pallida* Lam.

Nella seguente tesi sono stati utilizzati diversi metodi che permettono di valutare l'eventuale presenza di variabilità somaclonale. Sulle piante ottenute da embrioni somatici sono stati effettuati saggi chimici attraverso metodologia HPLC, con l'obiettivo di valutare se questo metodo di propagazione incide portasse a modificazioni nella produzione degli iridali. E' stata svolta una caratterizzazione morfologica ed istologica degli embrioni somatici ottenuti. Sono stati valutati, attraverso metodo fluorocitometrico, i contenuti di DNA al fine di comparare le piante madri e le piante rigenerate *in vitro*. Infine è stata realizzata l'estrazione di RNA dalle foglie.

Studio istologico degli embrioni di *I. pallida* Lam.

L'istologia (dal greco *ἵστός*, tela e *λόγος*, discorso) è la disciplina scientifica che studia i tessuti vegetali e animali. Lo studio dell'istologia ha avuto inizio nella metà del 700' dai lavori svolti da Albrecht von Haller, grande scienziato, letterato ed erudito del XVIII secolo, il quale fu il primo a suggerire una organizzazione strutturale microscopica dei

corpi viventi, che egli riconduceva a delle invisibili "fibre". I suoi studi erano però incentrati sull'istologia dei tessuti e degli organi degli animali. Gli organismi vegetali ed i loro tessuti presentano una struttura cellulare comune agli animali: citoplasma, nucleo, cromosomi, ecc. Tra le cellule animali e quelle vegetali esistono delle differenze strutturali in grado di modificare moltissimo i procedimenti necessari per l'osservazione al microscopio di tali strutture. Le principali differenze delle cellule vegetali rispetto a quelle animali sono:

- Parete cellulare (lignificata, suberificata, cutinizzata, ecc.), esterna rispetto alla "membrana" a doppio strato fosfolipidico, comune ad entrambi;
- Presenza dei vacuoli;
- Maggiore consistenza e spessore, non tanto per la rigidità della parete, ma per la capacità che esse hanno di sopportare una pressione interna, osmotica, molto elevata. Questa pressione determina il "turgore" delle cellule vegetali;

Quando si analizzano dei tessuti vegetali va tenuto presente che essi sono costituiti da complessi cellulari organizzati, formati da cellule più o meno differenziate e specializzate per lo svolgimento di una particolare funzione, che risulta strettamente vitale per la sopravvivenza dell'organismo e per questo mantengono anche la medesima forma e la medesima struttura. I tessuti vegetali originano dalla divisione di una o più cellule che per prime intraprendono uno specifico programma di sviluppo. Tale origine è caratteristica in quanto le nuove cellule conservano numerose comunicazioni plasmatiche, i plasmodesmi, che si insinuano in minuscoli canalicoli della parete cellulare, i porocanali. Tutte le cellule rimangono poi unite tra loro per mezzo della sopracitata lamella mediana. Nel caso dell'*I. pallida* sono state applicate tecniche di analisi microscopica dei tessuti con il fine di osservare le strutture embrionali nelle varie fasi di sviluppo.

CAP .5. CITOFUORIMETRIA

La citometria a flusso è una metodologia di analisi biologica quantitativa che permette di analizzare cellule o particelle subcellulari opportunamente estratte da un campione e trattate con uno specifico fluorocromo.

La citofluorimetria sfrutta le potenzialità della luce generata da una sorgente luminosa quando interagisce con un corpo in movimento. La luce incidente sulla particella verrà infatti diffratta e diffusa in base alla grandezza, alla forma ed alla costituzione fisica, modulando il segnale luminoso in maniera rappresentativa della costituzione intrinseca della particella stessa. La luce incidente fornisce inoltre un'energia di eccitazione in grado di portare ad uno stato instabile le molecole fluorescenti, per la presenza dei fluorocromi, presenti nella particella in esame, che decadendo emettono una quantità di luce misurabile e specifica della molecola stessa. Il fenomeno descritto è chiamato fluorescenza, assieme alla diffrazione e diffusione, è in grado di caratterizzare le singole particelle presenti nei campioni sottoposti ad analisi. L'apparecchio utilizzato per l'esame citofluorimetrico è in grado di effettuare un'analisi "multiparametrica" dei dati ottenuti dall'analisi di cellule e particelle subcellulari il cui diametro varia da 0,5 μm a 40 μm (con estensioni che possono arrivare ad un intervallo che va da 0,2 μm a 150 μm). Il campione rappresentato dalle particelle in sospensione viene focalizzato idrodinamicamente da una soluzione salina; questa veicola il campione fino al raggiungimento della linea di intercettazione del raggio laser, chiamato tecnicamente "punto di interrogazione".

Il fascio luminoso che colpisce le particelle produce:

- i) un' emissione di luce scatterata (dall'inglese scattering= diffrangere), legata alle caratteristiche conformazionali e dimensionali delle cellule
- ii) un' emissione fluorescente in virtù della colorazione del campione con specifico fluorocromo. Il raggio laser, genera uno stato di eccitazione che si manifesta attraverso l'emissione di energia fotonica.

Una caratteristica peculiare del citofluorimetro è quella di determinare la fluorescenza emessa da ogni singola particella a differenza della spettrofotometria che misura la media delle emissioni dell'intero campione e quindi di un insieme di particelle. La luce scatterata emessa dalle particelle in sospensione viene convertita in impulsi elettrici dal sistema di rilevamento ottico. La luce viene convogliata verso un detector (tubo fotomoltiplicatore) il quale fornisce, a sua volta, i segnali elettrici agli amplificatori lineari e logaritmici con

l'obiettivo di amplificare i segnali deboli ma anche quello di comprimere la scala per i segnali intensi. I segnali o impulsi così ottenuti vengono computati da un convertitore che li trasforma da analogici a digitali in modo che possano essere usati per l'elaborazione di istogrammi.

5.1 Composizione del citometro a flusso

I citometri a flusso sono costituiti essenzialmente da tre parti: fluidica, ottica ed elettronica.

- i) **Fluidica:** Il sistema fluidico (**Figura 5.1**) svolge la funzione di trasferimento ordinato del campione (particelle in sospensione) dalla provetta al punto di interrogazione dove vengono generati, cellula per cellula, i segnali luminosi che forniscono l'informazione multifattoriale. Nel fluido di convogliamento (una soluzione salina chiamata sheath fluid) le particelle corrono individualmente e vengono intercettate da una fonte luminosa (uno o più laser) in grado di generare segnali di fluorescenza, grazie alla presenza del fluorocromo, e di luce diffratta (scatter). Fondamentale, all'interno del sistema fluidico, è la camera di flusso e l'orifizio tarato di uscita nel quale lo sheath fluid pressurizzato, incontra il campione e lo comprime allungando il flusso di liquido contenente il campione; ne risulta la "focalizzazione idrodinamica" cioè la separazione e l'allineamento delle particelle del campione in un flusso di singoli elementi pronti ad essere esaminati nel punto d'interrogazione. Per ottenere ciò, è necessario che lo sheath fluid all'interno della camera scorra formando linee parallele senza turbolenze cioè generando un flusso laminare.

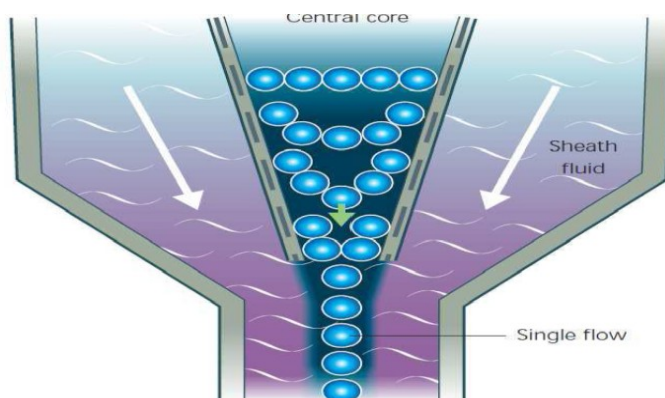


Figura 5.1: Trasferimento ordinato delle particelle in sospensione nella parte fluidica del citofluorimetro (BD-Accuri C6).

- ii) **Ottica:** la sorgente di eccitazione nei citometri è rappresentata da uno o più laser, usualmente a stato solido tipo LED (light emitting diode) a emissioni fisse. Altri laser con maggiori potenzialità permettono la gestione della lunghezza d'onda emessa, ad esempio laser a gas tipo argon che sono impiegati per applicazioni particolari e sono in grado di emettere fasci luminosi di potenza adeguata per molte applicazioni citofluorimetriche. Il fascio di luce emesso dal laser deve essere focalizzato in un punto specifico sul flusso di campione. Questo punto, detto "punto di interrogazione" ed è il luogo dove le particelle che corrono all'interno del flusso vengono analizzate una ad una. Come le particelle passano attraverso il punto di interrogazione, vengono eccitate dalla luce incidente, assorbono ed in parte diffrangono la luce di eccitazione ed infine emettono fluorescenza in ragione della loro struttura e della qualità del colorante associato. La luce diffratta in avanti (forward scatter) è raccolta da un sensore e convertita in impulsi di corrente. La luce diffusa ad angolo retto (side scatter) e la fluorescenza emessa dalle particelle sono raccolte da una lente posta a 90° rispetto al raggio di eccitazione. Il posizionamento di lenti di focalizzazione, specchi e filtri per la luce di lunghezza d'onda specifica, permette il rilevamento selettivo di questi segnali ottici (diffrazione e fluorescenza). Il percorso ottico seguito dalla luce emessa dalle particelle analizzate deve essere accuratamente controllato, poiché ogni ambito di variabilità indipendente da quella biologica propria del campione stesso, deve essere ridotta al minimo possibile per consentire un'analisi accurata. La valutazione del corretto allineamento viene effettuata cercando di ottenere il minor coefficiente di variazione (CV) sul picco del segnale rappresentante le singole particelle. Il CV è un parametro adimensionale che rappresenta la deviazione standard come una percentuale della media ($CV = SD / Media \times 100$), ed è una misura della deviazione dei valori del campione dal valore medio.
- iii) **Elettronica:** Nella maggior parte dei citometri troviamo due tipi di sensori: fotodiodi e tubi fotomoltiplicatori. I filtri presenti nello strumento permettono che i fotoni emessi da ogni particella analizzata vengano separati in base alla loro lunghezza d'onda e direzionati verso il relativo

detector (tubo fotomoltiplicatore). Questi hanno il compito di assorbire fotoni ed emettere elettroni, producendo quindi una corrente elettrica. La corrente prodotta deve essere convertita da segnale analogico a digitale. Le capacità dell'elettronica e la digitalizzazione del segnale rendono possibile una alta capacità di processo di questo tipo di analisi, con frequenze che si possono spingere ad analizzare 104 elementi per secondo. Una volta digitalizzati i segnali sono mostrati o tramite istogrammi che indicano la frequenza di distribuzione del parametro selezionato, o con dot plots che mostrano la correlazione fra due parametri, dove ogni punto corrisponde ad un singolo evento analizzato. Lo sviluppo dell'elettronica e dei software di gestione permettono di collezionare un elevato numero di dati e renderli visibili in una forma grafica.

5.2 La citometria a flusso nelle piante

I citometri sono prevalentemente usate per il controllo e il monitoraggio di cellule, di diversa natura, sottoposte a particolari stress o trattamenti dei quali si vuole conoscere l'effetto su una popolazione. Un'importantissima applicazione in ambito medico è la misurazione della quantità di DNA presente a livello nucleare, aspetto assai importante da diversi punti di vista: cellule non tumorali presentano la stessa quantità di DNA, mentre solitamente una cellula tumorale aumenta o diminuisce il suo normale contenuto di DNA. Attraverso il citofluorimetro è possibile analizzare il sangue e ricercare ad esempio un gruppo particolare di linfociti; se una certa percentuale di linfociti presenta una determinata percentuale di DNA oltre il valore normale è possibile dedurre la presenza di una leucemia. L'applicazione principale della citofluorimetria in ambito vegetale è, analogamente a quanto visto in ambito medico, il calcolo del contenuto di DNA. Esiste un'importante peculiarità dovuta al fatto che a differenza delle cellule animali in un campione vegetale la fluorescenza viene generata da due classi principali di molecole:

- 1) pigmenti endogeni della cellula, (clorofille, aminoacidi aromatici, alcaloidi ed altre molecole presenti sia nel nucleo che nel citoplasma);
- 2) fluorocromi, in grado di legarsi a specifiche componenti della cellula (proteine, acidi nucleici) o di evidenziare stati fisiologici (pH, contenuto di ioni)

Fluorocromi specifici per il DNA

La valutazione del contenuto di DNA attraverso citometro prevede l'ottenimento di sospensioni di nuclei e successiva colorazione con fluorocromi specifici che presentano due diverse modalità di legame al DNA:

- 1) Intercalazione e legame covalente;
- 2) Legame ionico in presenza di particolari coppie di basi azotate;

I fluorocromi più comunemente utilizzati sono il DAPI (4,6-diammino-2-fenilindolo), lo ioduro di propidio (PI) e la mitramicina (MIT). Il DAPI appartiene alla classe degli antibiotici sulfamidici ed è un derivato dell'indolo e mostra una preferenza per le coppie AT. Il suo legame al DNA avviene in due modi: quello ad alta affinità, tramite legame alle regioni ricche di sequenze di almeno 3-4 paia di basi AT, nel solco minore dell'elica, con un marcato aumento della resa quantica di fluorescenza, e quello a bassa affinità che non presenta specificità di sequenza, caratterizzato da una costante di legame più bassa e da un minor aumento nella resa quantica di fluorescenza. Alle concentrazioni più alte di colorante è prevalente il legame a bassa affinità, ragion per cui il colorante si usa in dosi sottosaturanti. Il DAPI viene eccitato da lunghezze d'onda appartenenti alla regione dell'UV, in particolare a 365 nm, emettendo estesamente nel blu con un massimo a 450 nm. Il PI appartiene agli intercalanti fenantrenici, come il bromuro di etidio, e non mostra specificità per coppie di basi; è in grado però di legarsi sia al DNA che all'RNA a doppio filamento e ciò rende necessario un trattamento con RNAsi, per evitare una elevata componente aspecifica nel segnale stesso. Per la colorazione il PI viene utilizzato in quantità saturanti. Il PI viene eccitato da lunghezze d'onda appartenenti alla zona del verde e dell'UV (massimi di eccitazione a 540 e 342 nm) ed emette nell'arancione-rosso con massimo di emissione a 615 nm (Dolezel et al. 1992).

Contenuto di DNA in nuclei in sospensione

L'analisi del contenuto di DNA avviene previa lisi dei protoplasti oppure per omogenizzazione dei tessuti seguendo il metodo descritto da Galbraith et al. 1983.

Il primo esperimento per la stima del contenuto di DNA è stato effettuato nei primi anni settanta (Heller 1973), ma il vero passo avanti nella metodica è stato realizzato da Galbraith con l'introduzione della metodologia del "chopping" per l'isolamento dei nuclei vegetali, che ha fatto della citometria a flusso il miglior metodo per la misura del contenuto di DNA nei vegetali.

La metodica prevede tre fasi operative:

- i) Chopping o sminuzzamento del materiale vegetale con lame in presenza di una soluzione tampone di estrazione;
- ii) Filtrazione dell'isolato per rimuovere i residui del tessuto grossolano;
- iii) Colorazione con fluorocromo specifico della sospensione.

Sono stati descritti circa 26 buffer di estrazione dei quali solo 4 sono comunemente usati in ambito vegetale. Un buon tampone di estrazione, oltre a rilasciare i nuclei dalle cellule in quantità sufficiente per permettere l'analisi, deve anche riuscire a mantenere l'integrità nucleare per tutto il processo, proteggere il DNA dalla degradazione delle endonucleasi e permettere la colorazione stechiometrica del DNA (Loureiro et al. 2006). Grazie alla metodologia introdotta da Galbraith et al. ed alle caratteristiche dello strumento la citometria a flusso presenta numerosi vantaggi rispetto ai metodi tradizionali per due motivi principali, la velocità di preparazione e l'elevata precisione dovuta al grande numero di nuclei che viene misurato in pochi minuti. Lo studio sui fluorocromi dà in oltre la possibilità di colorare i nuclei del campione in maniera omogenea.

5.3 Interpretazione dei risultati

Le cellule euploidi durante la duplicazione passano attraverso quattro fasi distinte indicate con le sigle: G1, S, G2, M (**Figura 5.2**). .

- i) **G1**: è l'inizio del ciclo di replicazione della cellula. Durante questa fase si verifica la sintesi di proteine e RNA, ma il contenuto di DNA rimane costante a 2C. Esiste anche un'altra fase, dove si collocano le cellule non replicanti, definite come cellule quiescenti o in fase G0. Sia le cellule in G0 che quelle in G1 hanno lo stesso quantitativo di DNA 2C e sono pertanto indistinguibili sulla base del solo contenuto di DNA. Vengono quindi identificate insieme come cellule in fase G0/G1.
- ii) **S**: ovvero Sintesi di DNA, inizia quando si cominciano a replicare le molecole di DNA e continua fino a che il contenuto di DNA della cellula sia stato interamente duplicato. Al termine della fase S il contenuto di DNA è quindi 4C.

- iii) **G₂**: la cellula si prepara alla divisione progredendo nella fase G₂ del ciclo. In questa fase il contenuto di DNA rimane invariato a 4C.
- iv) **M**: durante questa fase avviene la divisione o Mitosi cellulare. Il DNA rimane 4C fino a che la cellula si divide in due cellule figlie, ciascuna delle quali possiede un quantitativo di DNA 2C.

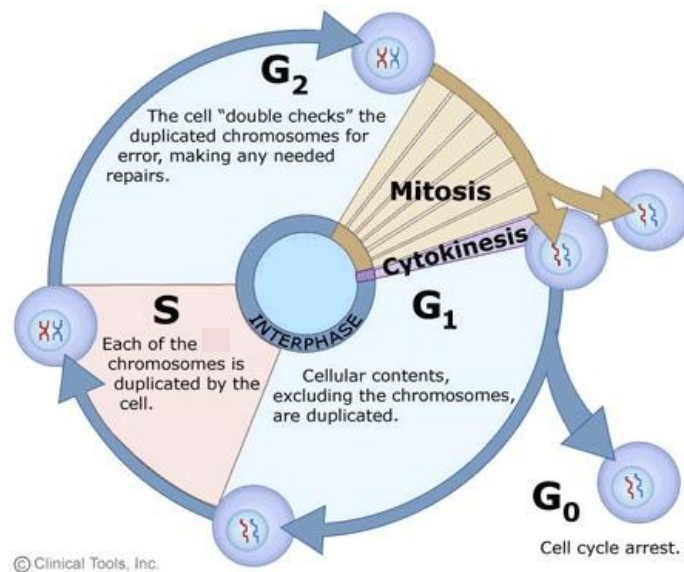


Figura 5.2: Fasi del ciclo cellulare teorico in specie euploidi (www.haikudeck.com)

Le analisi citofluorimetriche forniscono un istogramma di intensità relativa all'emissione fluorescente, ovvero tutti i nuclei che hanno lo stesso contenuto di DNA formeranno un gruppo ben isolato di elementi sull'istogramma, si formerà un picco. In un tipico istogramma di una specie euploide, l'analisi del contenuto di DNA tramite citofluorimetro viene indicata con riferimento alle diverse fasi del ciclo cellulare. Ciò è dovuto alla variazione ciclica del contenuto di DNA durante il processo coordinato di sintesi cellulare che viene palesata da una distribuzione di fluorescenza tipicamente bimodale, ossia con due picchi. Il primo picco, generalmente più numeroso poiché le cellule normalmente vi stazionano quando sono in fase di riposo, rappresenta la fase G₁ e l'altro, che si forma esattamente al valore doppio, rappresenta la fase G₂ del ciclo cellulare (Ochatt 2008; Greilhuber e Dolezel, 2009;). La distribuzione del contenuto di DNA ottenuta in

citometria può mostrare delle variazioni (per esempio i picchi G0/G1 e G2/M sono più larghi del previsto) a causa dell'intervento di variabili nella preparazione del campione, colorazione del DNA, fattori strumentali e naturali variazioni nel contenuto di DNA delle cellule. Un tipico esempio di istogramma è stato ottenuto dall'analisi dei nuclei purificati di *Lycopersicon esculentum* L. riportato in **Figura 5.3**.

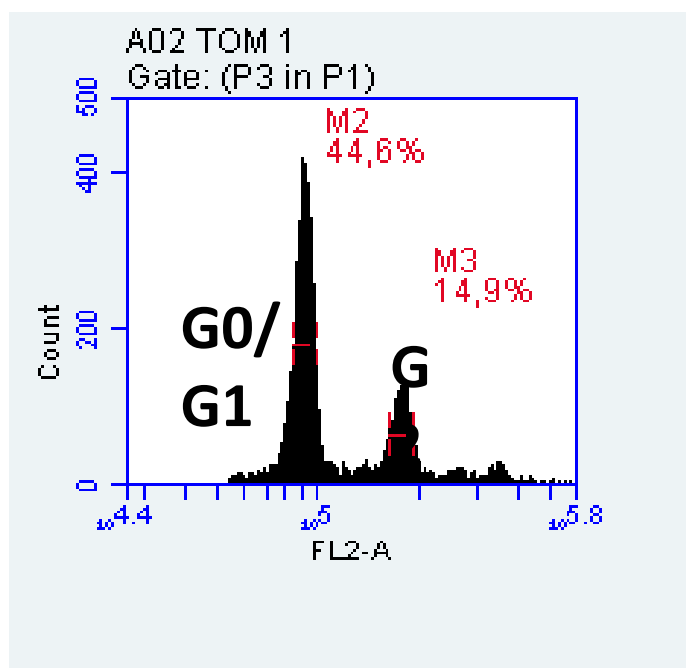


Figura 5.3: Ciclo cellulare di analisi al citofluorimetro

In questi istogrammi, l'analisi citometrica a flusso mostra l'intensità di fluorescenza relativa del contenuto di DNA; per avere una misura assoluta del contenuto di DNA dobbiamo confrontare il nostro campione sconosciuto con uno standard di riferimento a contenuto di DNA noto. Lo standard può essere esterno (campione noto analizzato separatamente da quello biologico in studio) o interno (standard inserito nella stessa soluzione del campione biologico); quest'ultimo è da preferirsi poiché consente di eliminare la variabilità associata alle procedure di colorazione e trattamento separate, che invece caratterizzano l'uso di uno standard esterno (Dolezel, 1991). Lo standard viene scelto per affinità con la specie in esame e in maniera tale che il contenuto di DNA non sia troppo diverso dal campione, per evitare errori dovuti alla eccessiva differenza del segnale; bisogna anche evitare che esso sia troppo simile e che si vada a sovrapporre al campione

rendendo impossibile la comparazione. La misura assoluta del contenuto di DNA di un campione è calcolata sulla base del valore medio della fluorescenza del picco in G1 rispetto a quello dello standard di riferimento:

DNA del campione ignoto =

[(G1 campione)/(G1 standard)] X contenuto 2C DNA standard (pg DNA)

Per stimare con precisione il contenuto in ng di DNA di una specie, devono essere analizzate diverse piante ed ognuna di esse deve essere analizzata più volte al fine di mediare la variabilità sperimentale strumentale e ridurre l'apporto nel corso della misura del contenuto di DNA effettivo.

CAP.6. PARTE SPERIMENTALE

Obiettivi del lavoro

Il lavoro sperimentale svolto in questa tesi ha come obiettivo quello di approfondire ed implementare quanto fin ora realizzato per la messa a punto di un protocollo per la micropropagazione via embriogenesi somatica dell'*I. pallida* Lam. Recentemente è stato condotto uno studio che ha portato alla realizzazione di un protocollo per la micropropagazione via embriogenesi somatica di questa specie. Questa metodologia rappresenta uno strumento efficace ed economicamente vantaggioso per le aziende leader in questo settore. La funzionalità di questo protocollo, dipende dalla qualità del materiale che esso riesce a produrre. Da qui la necessità di approfondire, con l'applicazione di diverse metodologie, le conoscenze sulla variabilità somaclonale tali da garantire l'identità fra i cloni di *I. pallida* prodotti.

A tal fine sono stati realizzati i seguenti esperimenti:

1. Valutazione dei mezzi di coltura e dell'andamento dell'embriogenesi;
2. Studio istologico degli embrioni zigotici e somatici;
3. Analisi chimica fine degli estratti di rizoma;
4. Analisi citofluorimetrica di estratti purificati di nuclei;
5. Estrazione dell'RNA
6. Caratterizzazione morfologica;
7. Produzione di Semi Sintetici;

7.1 MATERIALI E METODI

Valutazione dei mezzi di coltura e dell'andamento dell'embriogenesi

Per le prove relative alla valutazione dei mezzi di coltura e dell'andamento dell'embriogenesi, il materiale vegetale, dal quale deriva la popolazione *in vitro* presente al Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa, è stato fornito dall'azienda Vernini (Montevarchi AR) una delle aziende appartenenti all'Associazione Toscana Giaggiolo. Il callo embriogenico viene ottenuto utilizzando porzioni basali di foglie prelevate da plantule prodotte *in vitro* via embriogenesi somatica, a loro volta ottenuti partendo da espianti prelevati da fiori non ancora maturi (bocci).

Il protocollo per ottenere le plantule dai bocci è stato il seguente: I bocci vengono sterilizzati tramite un'immersione istantanea in etanolo al 70%, sciacquati in H₂O sterile per 1 volta e successivamente immersi in una soluzione al 15% di ipoclorito di sodio (NaClO; 8% cloro attivo) per 20 minuti. La parte finale della sterilizzazione prevede che i bocci debbano essere lavati per diverse volte con H₂O sterile, in modo da allontanare completamente l'ipoclorito di sodio. Le guaine esterne del fiore devono essere eliminate, mentre le varie parti del fiore, ridotte in porzioni di circa 0.5 cm, in condizioni di sterilità, vengono collocate su piastre Petri da 6 cm Ø e incubate al buio a 23 ± 1 ° C per l'induzione del callo su un mezzo MS arricchito con auxine. Gli espianti vengono trasferiti su un nuovo mezzo ogni tre settimane. Successivamente, gli espianti che hanno formato il callo, sono stati collocati alla luce ($70 \text{ mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) con un fotoperiodo di 16 ore su un mezzo privo di auxine. In queste condizioni sul callo si sviluppano degli embrioni, che a loro volta vengono prelevati e posti su un terzo terreno di coltura, in vaschette di dimensioni adeguate per consentire la germinazione e lo sviluppo delle giovani plantule. Le giovani piantine rigenerate dagli embrioni somatici sono state prelevate dai vasetti *in vitro* e lavate accuratamente sotto acqua corrente in modo da rimuovere i residui di mezzo nutritivo che può provocare l'insorgenza di malattie fungine. Sono state poi trapiantate in contenitori alveolati riempiti con una miscela di torba e perlite (1:3) e collocate in serra per 45-60 giorni. Durante le prime due settimane, le piantine sono state coltivate sotto una copertura in polietilene, in modo da mantenere alta l'umidità relativa. L'irrigazione delle piante è stata effettuata utilizzando il "fog system" con due interventi al giorno della durata di 30 secondi. Queste procedure avevano come obiettivo quello di fare acclimatare la pianta ad un nuovo ambiente, completamente diverso da quello *in vitro*. Dopo 15 giorni, le piantine

più sviluppate sono state trasferite in vasi (90 mm Ø) e bagnate con un sistema di irrigazione a goccia. Alla fine del periodo di acclimatazione le piante sono state trapiantate in campo. I mezzi utilizzati, descritti nella **Tabella 6.1.1**, si distinguono in base alle fasi tipiche dell'embriogenesi somatica e sono stati indicati come:

- I1 (I+ e I-) per l'induzione di callo; si tratta di un mezzo di Murashige e Skoog (MS, 1962) modificato aggiungendo 1 mg/L di 2,4 D e 1 mg/L di chinetina;
- I2 per l'induzione dell'embriogenesi; si tratta di un mezzo Knudson C modificato aggiungendo 0.1mg/L di IBA e 1 mg/L di chinetina;
- I3 per la germinazione degli embrioni e lo sviluppo delle plantule, un mezzo Knudson C senza fitoregolatori.

Una parte delle plantule sviluppate sul mezzo I3 può essere usata per iniziare un nuovo ciclo a partire da espianti della parte basale delle foglie, che possono essere nuovamente stimulate a formare callo se poste sul mezzo I1. I vantaggi di questo sistema sono l'assenza di inquinamento (poiché la piante *in vitro* sono già sterili) e la disponibilità di materiale da usare come espianto durante tutto l'anno.

E' stata valutata la crescita dei calli embriogenetici derivanti da questi espianti sui mezzi I1+ ed I1-, che differivano per le concentrazioni di saccarosio, rispettivamente del 50 g/L (I1+) e 30 g/L (I1-). Tale esperimento è stato condotto perché non era nota la concentrazione ottimale per lo sviluppo del callo per questo tipo di espianti di *I. pallida*. Lam.

Gli espianti sono stati posti al buio in cella climatica a 23 ± 1 °C per un periodo di 4 settimane. Sono stati realizzati 32 campioni di callo di circa $0,1 \pm 1$ g ciascuno. Ogni campione è stato contrassegnato all'interno delle piastre Petri e ogni settimana 8 campioni (4 per tesi) sono stati pesati e confrontati con il loro peso iniziale.

Per indurre la fase di differenziazione degli embrioni, i calli sono stati trasferiti sul terreno I2 privo di 2,4 D poiché l'auxina inizialmente necessaria per la proliferazione delle masse pro-embriogeniche, è in grado di inibire lo sviluppo degli embrioni somatici (Filonova et al., 2000). Del callo posto sul mezzo I2 sono state valutate la % di callo embriogenico e la % di embriogenesi. Abbiamo notato che lasciando il callo sul mezzo I1 per un tempo maggiore di 3 settimane, esso è in grado di differenziare embrioni probabilmente in conseguenza della diminuzione progressiva della concentrazione di 2,4 D nel terreno di coltura. Abbiamo deciso di analizzare una coltura stabile di callo dalla quale prelevare gli embrioni maturi da porre direttamente sul mezzo I3. Tale coltura è stata analizzata per un

periodo di sei mesi, sui mezzi I+ e I-.

Tabella 6.1.1: Composizione dei mezzi di coltura usati per l’embriogenesi somatica di *I. pallida* Lam.

	Mezzo induzione callo I1-	Mezzo induzione callo I1+	Espressione degli embrioni I2	Germinazione embrioni I3
Macro elementi	MS	MS	Knudson C + feEdtaMS	Knudson C + feEdtaMS
Microelementi	MS	MS		
Vitamine	MS	MS	B5	B5
Saccarosio	30 g/L	50 g/L	20 g/L	20 g/L
MES	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L
GSH	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L
Caseina idrolizz.	250 mg/L	250 mg/L		
Prolina	250 mg/L	250 mg/L		
Tirosina	250 mg/L	250 mg/L		
2,4 D	1 mg/L	1 mg/L		
IBA			0.1 mg/L	
Kinetina	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L	
Gelrite	3 mg/L	3 mg/L	3 mg/L	3 mg/L
pH	5.9	5.9	5.9	5.9

Studio istologico degli embrioni zigotici e somatici

Per lo studio istologico degli embrioni zigotici e somatici sono state applicate tecniche di analisi microscopica dei tessuti con il fine di osservare le strutture embrionali (somatiche e zigotiche) nelle varie fasi di sviluppo. La loro individuazione visiva è abbastanza semplificata dalle dimensioni e dal colore degli embrioni (ad esempio, quelli somatici risultano di colore bianco, sviluppati su un callo di colore giallo), confermato per gli embrioni più piccoli con l’uso di uno stereoscopio . Per quanto riguarda le caratteristiche istologiche dalle immagini degli embrioni negli stadi primordiali o addirittura di cellule pre-determinate, possono essere individuate dalla presenza di cellule i fase di divisione (figure mitotiche). La messa a punto del protocollo idoneo alla realizzazione di sezioni fini di embrioni somatici e di embrioni zigotici prodotti da colture *in vitro* di *I. pallida* è stata svolta eseguendo dapprima una preparazione del materiale vegetale che prevedeva:

- a) Fissazione dei tessuti in FAA (45% etanolo assoluto, 5% acido acetico glaciale, 10% formaldeide, 40% acqua distillata)
- b) Disidratazione (realizzata attraverso una serie di alcool etilico a crescente concentrazione: 50% - 70% - 80% - 96% - 100%, per 30 minuti ciascuno)
- c) Infiltrazione: permette alla paraffina di infiltrarsi gradualmente nei tessuti senza alterarli. Il processo a sua volta prevede i seguenti bagni ciascuno di 30 minuti:
 - soluzione composta da toluene e etanolo in egual volume.
 - toluene al 100%
 - miscela tra toluene e paraffina liquida in egual volume da mantenere in stufa a 56-58°C
 - bagno in paraffina liquida (over night)
 - solidificazione con l'ausilio di supporti in plastica.

I tessuti sono stati mantenuti nei fissativi 16h dopo di che sono stati accuratamente lavati per eliminare ogni traccia di fissativo.

La seconda fase consiste nella realizzazione delle sezioni fini e colorazione. Gli embrioni sono stati sezionati con il microtomo ad uno spessore di 8 µm per ogni tipo di embrione, somatico e zigotico, sono state fatte 5 repliche.

I coloranti che sono stati usati sono:

- a) **Blu di Toluidina**: utilizzata osservare le strutture cellulari. Si tratta di un colorante metacromatico che riesce a differenziare abbastanza bene le pareti pecto-cellulosiche (viola) dalle pareti secondarie e/o modificate (azzurro). E' specifico per i polisaccaridi carbossilati, presenti nelle lamelle mediane e nelle pareti di tipo primario che assumono una colorazione rosato porpora.
- b) **Coomassie Brilliant Blu** : colorazione che evidenzia i composti proteici. I nuclei vengono colorati più scuri mentre il citoplasma risulta chiaro.
- c) **Schiff's (PAS vedi corretto)**: colorazione che evidenzia i carboidrati proteoglicani e glicoproteine nei tessuti vegetali. Esso si basa sulla reazione di acido periodico che ossida selettivamente i residui di glucosio e crea aldeidi reagendo con il reagente di Schiff (prodotto di fuchsine o pararosanilina e bisolfito di sodio) e producendo un colore magenta.

Infine i preparati istologici sono stati osservati al microscopio ottico utilizzando vari ingrandimenti x100; x200; x400.

Analisi chimica fine degli estratti di rizoma

I rizomi utilizzati per le analisi fitochimiche sono stati quelli di *I. pallida* provenienti da piante dell'azienda Vernini di Castelfranco di Sopra (AR) e quelli delle piante acclimate *ex vitro* entrambe coltivate in pieno campo rispettivamente per 4 anni e 3 anni presso il dipartimento DiSAAAa. Questi sono stati puliti, pelati, tagliati in piccoli pezzi e conservati in congelatore a -80°C. Ciascun campione (1g) è stato estratto con 10 ml di acetone. Inizialmente il tessuto congelato è stato macinato in mortaio con 5 ml del solvente di estrazione, trasferito in tubi di plastica da 10 ml e mantenuto in agitazione magnetica su bagno di ghiaccio per 4 ore. L'estratto è stato conservato in congelatore a -20°C per una notte e centrifugato a 2500g per 5 minuti. Dopo separazione del surnatante, il materiale vegetale è stato nuovamente estratto con di 5 ml di solvente fresco. Le due aliquote di surnatante così ottenute sono state riunite e filtrate su filtro da siringa Chromafil® (Macherey-Nagel, Düren, Germania) con membrana ad esteri misti di cellulosa, dimensione dei pori 0.45 µm e diametro 25 mm. Gli estratti filtrati sono stati analizzati tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Le analisi sono state condotte su quattro replicati per ogni campione. La strumentazione HPLC utilizzata (Jasco, Tokyo, Giappone) era costituita da una pompa quaternaria a bassa pressione PU-2089 ed un rivelatore spettrofotometrico multicanale UV-2077. Le analisi sono state condotte a temperatura ambiente con una colonna C18 250/4.6 Nucleodur® Isis 100-5 (Macherey-Nagel, Düren, Germania) a 235 245, 254 e 265 nm, flusso 1 ml min⁻¹ e volume di iniezione 20 µl. Gli eluenti utilizzati sono stati metanolo (solvente A) ed acqua (solvente B) con il seguente gradiente di eluizione: 0-2 min, A 75%; 2-22 min, A 75-100%; 22-28 min, A 100%; 28-28.5 min, A 100-75%; 28.5-30 min, A 75%. Per l'identificazione dei picchi sono state eseguite anche analisi cromatografiche abbinate alla spettrometria di massa (LC-MS ed LC-MS-MS), utilizzando lo stesso gradiente di eluizione e la stessa colonna impiegata per le analisi con rivelazione UV. Poiché gli standard puri per gli iridali non sono reperibili in commercio, i due composti sono stati isolati individualmente mediante cromatografia semipreparativa, utilizzando una colonna Macherey-Nagel (Düren, Germania) VarioPrep Nucleodur C18 Isis 5µm, 10x250 mm. Le due frazioni contenenti un iridale ciascuna sono state raccolte separatamente e, dopo evaporazione dell'eluente, ciascun iridale è stato pesato e disciolto in un piccolo volume noto di acetone. Da queste

due soluzioni standard sono state ottenute per opportuna diluizione le soluzioni utilizzate per la calibrazione.

Analisi citofluorimetrica di estratti purificati di nuclei

Le analisi citofluorimetriche sono state effettuate seguendo il metodo descritto da Galbraith et al.1983. Oltre all'*I. pallida*, sono state utilizzate 4 specie da usare come standard di riferimento a contenuto di DNA noto. Le specie utilizzate come standard sono state fornite da Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research IPK (<http://www.ipk-gatersleben.de>) e sono state:

- Pomodoro: *Lycopersicon esculentum* Mill. convar. *infiniens* Lehm. var. *flammatum* Lehm. (codice LYC 418)
- Tabacco: *Nicotiana tabacum* L. var. *lingua Schrank Xanthi* (NIC 380)
- Basilico: *Ocimum basilicum* L. var. *basilicum* L. cv. *Genovese* (OCI 80)

Oltre a queste varietà è stato utilizzato *Pisum sativum* L. (Pisello) del quale è stato stimato il contenuto in pg di DNA, poi confrontato con i dati presenti in letteratura.

I semi di tutte le specie a disposizione sono stati fatti germinare e sviluppare *in vitro* e *in vivo*. Il contenuto di 2c DNA è stato fornito dal database (<http://www.kew.org/visit-kew-gardens>) creato da Royal Botanic Gardens, Kew.

Per l'*I. pallida* sono state prelevate porzioni (500 mg) di foglie giovani di piantine sviluppate in serra. Dalle piante utilizzate come standard sono state prelevate porzioni di tessuto fogliare di 250mg. Per la scelta di usare una maggiore quantità di tessuto per i campioni di *I. pallida* è stato determinante avere effettuato prove preliminari in cui è stata osservata una scarsa resa di nuclei per *I.pallida* Lam. rispetto alle altre specie utilizzate.

La prima fase prevedeva il “chopping” o sminuzzamento (lame N.10 Aesculap AG & CO, Germany) del materiale vegetale, immerso in soluzione di estrazione preraffreddata chiamata Modified Galbraith (MG). Tale procedura deve essere effettuata a basse temperature che si realizzano utilizzando una piastra Petri appoggiata sul ghiaccio. La soluzione di estrazione (Galbraith’s buffer, Galbraith et al.; 1983) da noi modificata (MG), è costituita da: 45 mM MgCl₂, 30 mM citrate di sodio, 20 mM acido 3 propansolfonico (MOPS), 0.3 % Triton X-100, Polyvinylpyrrolidone 10.000 all’1% e metabisolfito di sodio 10 mM; il pH deve essere aggiustato con NaOH fino alla neutralità. La seconda fase consiste nella filtrazione dei nuclei isolati per rimuovere i residui con setacci di nylon autoclavabili con porosità di 50 e 30 µm pre-umidificati con buffer MG freddo. Durante la

terza ed ultima fase della preparazione dei campioni è stata effettuata la colorazione con fluorocromi specifici della sospensione e l'aggiunta delle RNase. A tal fine, abbiamo aggiunto 2.5 µL di RNase alle eppendorf "RNase free" e 0.5 mL di filtrato (50 µL in 450 µL di filtrato). Il fluorocromo che abbiamo utilizzato è il Propidio di Ioduro 50 µg/ml (PI stock solution: 1 mg/mL). Il materiale deve essere lasciato ad incubare a 4°C e al buio per un paio di ore.

Sono stati realizzati 14 campioni:

1. *I. pallida* Pianta Madre (PM)
2. *I. pallida* Pianta Vitro (PV)
3. *Lycopersicon esculentum* L.
4. *Pisum sativum* L.
5. *I. pallida* (PM) + *I. pallida* (PV)
6. *I. pallida* (PM) + *Lycopersicon esculentum* L.
7. *I. pallida* (PV) + *Lycopersicon esculentum* L.
8. *I. pallida* (PM) + *Pisum sativum* L.
9. *I. pallida* (PV) + *Pisum sativum* L.
10. *Ocimum basilicum* L. + *Nicotiana tabacum* L.
11. *I. pallida* (PM) + *Nicotiana tabacum*: L.
12. *I. pallida* (PV) + *Nicotiana tabacum*
13. *I. pallida* (PM) + *Nicotiana tabacum* + *Ocimum basilicum* L.
14. *I. pallida* (PV) + *Nicotiana tabacum* + *Ocimum basilicum* L.

Le specie standard sono state coltivate *in vivo* in ambiente protetto oppure *in vitro*. Germogli iniziali delle piante di *Iris* usate per questi esperimenti sono state prelevate in pieno campo e fatte crescere in ambiente protetto.

Foglie provenienti dalle 2 tesi dell'*I. pallida* Lam. (PM e PV) sono state sminuzzate insieme, con il fine di annullare l'errore del processo di estrazione dei nuclei e della lettura

dello strumento, in modo da ottenere un unico istogramma. Inoltre per aumentare i dati relativi alle differenze tra *I. pallida* Lam., PM e PV sono state realizzate ripetizioni separate delle due tesi. Queste analisi non hanno solamente l'obiettivo di valutare la possibile presenza di fenomeni di poliploidia legati alla condizione di sviluppo *in vitro* ma anche quello di stimare il contenuto di DNA 2C dell'*I. pallida* Lam. Le letture dei campioni sono state effettuate con il citofluorimetro BD Accuri™ C6 Plus presso l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa. I parametri che abbiamo valutato in ciascun campione sono stati:

- Diffusione della luce retta (FS, per la stima relativa della dimensione delle particelle);
- Luce laterale scatter (SS, per la stima relativa della complessità ottica delle particelle);
- Intensità della fluorescenza relativa dei del PI legato ai nuclei (FL);
- C-values (CV) del picco G0/G1, un parametro che permette di stimare integrità dei nuclei e la variazione di colorazione del DNA (< 5%, Galbraith et al., 2002) ;

Il valore soglia di eventi letti dal BD C6 è di 80,000 ma noi lo abbiamo abbassato a 10,000 per evitare l'acquisizione di dati irrilevanti, come suggerito dalla stessa casa costruttrice dello strumento. I dati sono stati elaborati con BD Accuri™ C6 Software, che segue un processo a gate, riportato in **Figura 6.1.2**. Inizialmente vengono creati dei gate, sui plot bi-parametrici (dove vengono messe in relazione due fluorescenze), successivamente i dati che sono stati inclusi nei gate vengono riportati sul plot monoparametrico che mette in relazione il numero degli eventi con le fluorescenze lette dallo strumento.

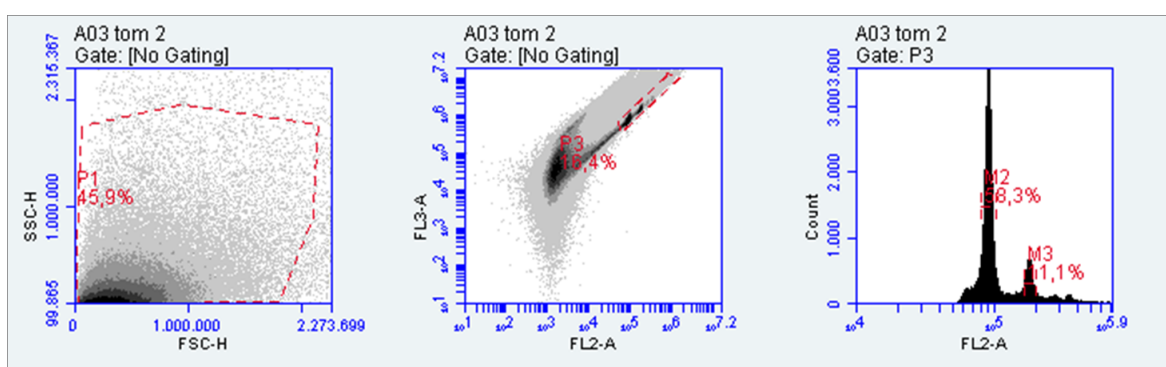


Figura 6.1.2: Schematizzazione di un'analisi realizzata con BD Accuri™ C6 Software. Le linee rosse tratteggiate, nei primi due plot rappresentano i gate di selezione.

Estrazione dell'RNA

È stata realizzata l'estrazione di RNA con il fine di valutare i profili d'espressione di alcuni geni implicati nella via di biosintesi dei triterpeni. L'obiettivo è quello di ottenere, una soluzione concentrata di RNA (per ogni singolo campione) che abbia dei parametri qualitativi adeguati ad un'analisi trascrittomica, con metodo ILLUMINA. Il materiale vegetale utilizzato è costituito da 3 campioni biologici indipendenti: Pianta madre Firenze (A) di 3 anni cresciuta presso l'Azienda Vernini (Arezzo), Pianta madre Pisa (B) di 4 anni (derivante dalle piante dell'Azienda Vernini) e Pianta micropropagata Pisa (C) di 3 anni (derivante da embriogenesi somatica a partire da espianti dei boccioli). Queste ultime due tipologie di piante sono state cresciute e raccolte a Pisa. È stato realizzato un mix di circa 7 foglie provenienti da piante diverse per ogni singolo campione. I campioni così formati sono stati immediatamente trasferiti in azoto. Da questi campioni è stato estratto l'RNA totale, utilizzando il kit Spectrum™ Plant Total RNA (Sigma, Italia) secondo il protocollo fornito dalla ditta. La concentrazione totale di RNA è stata misurata con lo strumento NanoDrop ND-100 (Thermo Scientific, Italia) e la qualità è stata valutata con un kit di RNA 6000 Nano LabChip utilizzando lo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Italia).

Caratterizzazione morfologica

La caratterizzazione morfologica delle piante di *Iris* è stata effettuata durante la stagione primaverile 2012. A questo proposito sono state acclimatate le prime piante di *I. pallida* L. ottenute attraverso il protocollo di micropropagazione *in vitro* via embriogenesi somatica a partire da espianti provenienti dai boccioli immaturi da noi chiamate "Piante micropropagate da fiore". Alcune di queste sono state trapiantate presso nei campi sperimentali di Orticoltura e Floricoltura del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa, accanto alle piante utilizzate come fonte dei boccioli (perciò da noi chiamate Pianta Madre). Nell'anno successivo abbiamo trapiantato, sullo stesso appezzamento, le piante micropropagate, ottenute usando come espianto la base delle foglie di plantule coltivate *in vitro* chiamate "Pianta da *vitro* (Foglia)". Le piante sono state valutate in data 30/04/2015, i parametri rilevati sono stati:

1. Pianta Fiorite (%);
2. N° steli Fiorali;

3. N° boccioli per stelo;
4. Peso fresco stelo (g);
5. Peso secco stelo (g);
6. Peso secco stelo (%);
7. Altezza stelo Fiorale (cm);

La valutazione morfologica è stata effettuata con il fine di mettere in evidenza l'eventuale presenza di differenze facilmente identificabili da usare come spie di variazioni somaclonali.

Produzione semi sintetici

Per la produzione di semi sintetici gli embrioni utilizzati per l'esperimento sono stati prelevati da una coltura di callo embriogenico di *I. pallida* Lam. Sono stati utilizzati gli embrioni che si staccavano facilmente dalla massa di callo in maniera che subissero il minor stress possibile. Le capsule sono state realizzate in alginato di calcio addizionato con nutrienti. In particolare è stata realizzata una soluzione miscelando un mezzo MS a mezza forza Ca esente con 25 g/L di alginato di Na, alla quale abbiamo aggiunto gli embrioni preventivamente separati dal callo. Da questa sospensione sono stati prelevati, uno ad uno, gli embrioni e la soluzione con l'ausilio di una pipetta Eppendorf; questi sono stati lasciati cadere in una beuta contenente una soluzione concentrata di CaCl₂ (1,1%). Una volta che le gocce contenenti gli embrioni vengono a contatto con il calcio si solidificano immediatamente ma devono essere lasciate in sospensione per 30 minuti affinché siano completamente solidi. Il pH di tutti i mezzi e delle soluzioni utilizzate nell'esperimento è stato regolato a 5,6. Tutto il processo è stato condotto in condizioni di sterilità, le soluzioni sono state sterilizzate in autoclave a 121,8 °C per 20 min.

I semi ottenuti sono stati posti su piastre Petri (Ø 50mm) con un filtro sterile di carta all'interno per eliminare l'eccesso di acqua. Le piastre ottenute sono state conservate per un periodo di 14 e 28 giorni a due temperature diverse, 4°C e 23°C.

Abbiamo realizzato 4 tesi più il controllo:

1. Semi conservati per 0 giorni (Controllo)
2. Semi conservati per 14 giorni a 23°C
3. Semi conservati per 14 giorni a 4°C

4. Semi conservati per 28 giorni a 23°C
5. Semi conservati per 28 giorni a 4°C

Settimanalmente sono stati registrati i valori relativi all'imbrunimento, alla germinazione e al rapporto semi/germogli.

Analisi statistica

Alla fine di ogni subcultura (tre settimane), le percentuali medie ($n = 20$ espianti; 4 espianti / piastra Petri), sono stati calcolati sui seguenti parametri: la formazione del callo (numero di espianti producono callo / piastra), espianti necrotici (numero di espianti con necrosi / piastra) espressione di embrioni (numero di espianti produrre embrioni / piastra). Le percentuali callo e embrioni sono stati trasformati secondo la trasformazione angolare Bliss [$\arcsin (\% / 100)$] prima delle analisi statistiche. I valori medi \pm SE ($n = 20$) sono riportati nelle figure. L'analisi statistica (ANOVA ad una via; $P \leq 0.05$) è stata condotta entro ogni categoria (tipologia di espianto o data di campionamento).

Le analisi statistiche (ANOVA a due vie $P \leq 0.05$, $n = 5$) dei dati di citofluorimetria sono state effettuate sia per verificare differenze statistiche fra i diversi esperimenti effettuati ($n=4$), sia per valutare differenze statistiche fra *I. pallida* Pianta Madre e Pianta Vitro. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando GraphPad Prism versione 6.05.

7.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

Valutazione dei mezzi di coltura e dell'andamento dell'embriogenesi

Dall'esperimento volto a chiarire quale dei due mezzi (I+ e I-) determina la performance migliore è emerso che una minore quantità di saccarosio permette un maggiore sviluppo del callo durante la 3° e 4° settimana di coltura mentre non si evincono differenze nelle settimane 1° e 2°, coerentemente a quanto riportato da Meyer e Van Staden (1995) **Figura 6.2.1**. Probabilmente la quantità maggiore di zuccheri nell'I+ non si traduce in un aumento di sviluppo a causa della maggiore pressione osmotica che il mezzo esercita sugli espianti. Le performance del callo embriogenico sono state valutate sul mezzo I2. I dati, riportati nel **Figura 6.2.2**, mostrano che a differenza del callo, che continua a svilupparsi, la formazione degli embrioni diminuisce nel tempo. Questa tendenza è stata confermata dall'ultimo esperimento, nel quale è stata osservata la variazione nella percentuale di embriogenesi e di formazione del callo.

Non sono state rilevate differenze significative nella percentuale di callo e di embrioni formati sui due mezzi testati (I+ e I-). In entrambe le tesi, è stato possibile osservare una sostanziale diminuzione dell'embriogenesi dopo il 5° mese (**Figura 6.2.3**). Il motivo di ciò può essere spiegato analizzando il protocollo di produzione che prevede il periodico prelievo degli embrioni dal callo, lasciando quest'ultimo in coltura. Probabilmente in colture stabili di callo la massiccia presenza di ormoni (ad esempio il 2,4 D) si traduce nell'incapacità di formare cellule pro-embriogenetiche e quindi di formare embrioni. Ma non solo, l'esperienza sul mezzo I2, del secondo esperimento, ci ha fatto capire che la mancata differenziazione degli embrioni, non dipende solamente dalla presenza delle auxine ma anche dal fatto che una volta intrapreso il processo di differenziazione cellulare le cellule del callo non sono più in grado di proseguire nella formazione degli embrioni, regredendo continuamente allo stadio di callo. Per tale motivo risulta poco conveniente costituire colture stabili di callo per il prelievo degli embrioni, risulta invece più conveniente la periodica induzione di espianti di base foglia (di plantule *in vitro*) che permettono di ottenere un callo con un picco massimo di embriogenesi intorno al 4° e o 5° mese di coltura. Diversamente, analizzando la formazione di callo ed embrioni, usando come espianto primario la base del fiore immaturo (prelevato dalle colture *in vivo*) si è potuto osservare, in precedenti esperienze (**Figura 6.2.4**), che i processi sono più lenti, ma

hanno un trend crescente, e quindi una resa maggiore, rispetto a quanto osservato per l'induzione di espianti primari da base di foglie (*in vitro*).

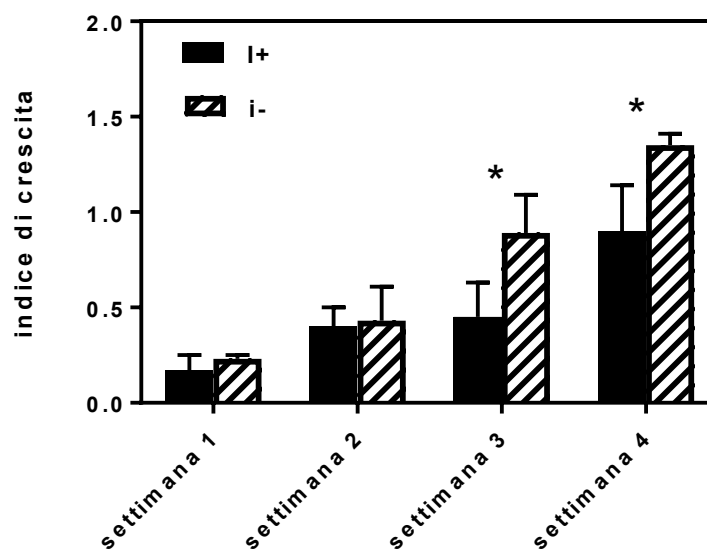


Figura 6.2.1 : Variazione dell'Indice di crescita di una cultura di callo in 4 settimane su due diversi mezzi di coltura: I+(50 g/L di saccarosio) e I- (30 g/L di saccarosio)

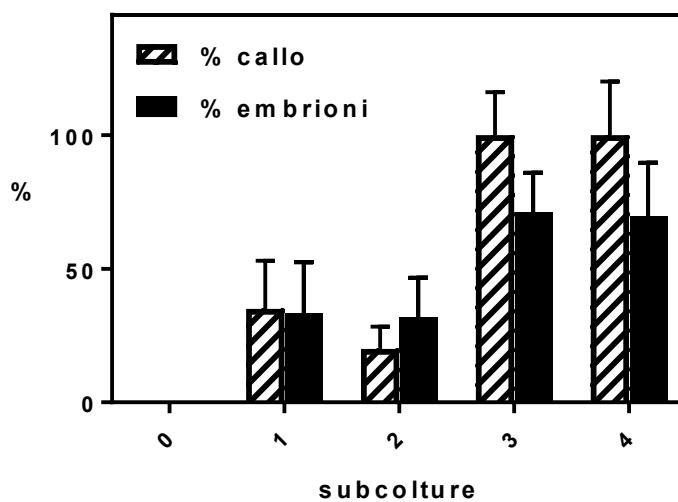


Figura 6.2.2: Variazione della percentuale di callo embriogenico e degli embrioni di in 4 subcolture su I2 alla luce ($70 \text{ micromol s}^{-1}\text{m}^{-2}$)

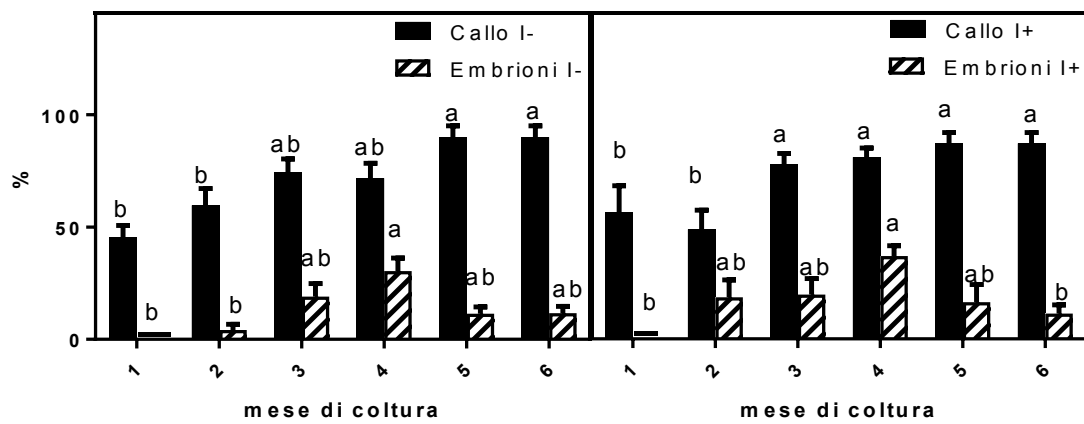


Figura 6.2.3: Analisi di due culture di callo (I- a sinistra e I+ a destra) da base foglie (*in vitro*), destinate alla formazione di embrioni somatici, *I. pallida* Lam. Test ANOVA ad una via ($P \pm 0.05$) fra i tempi dei rilievi. A lettere diverse corrispondono medie diverse statisticamente significative.

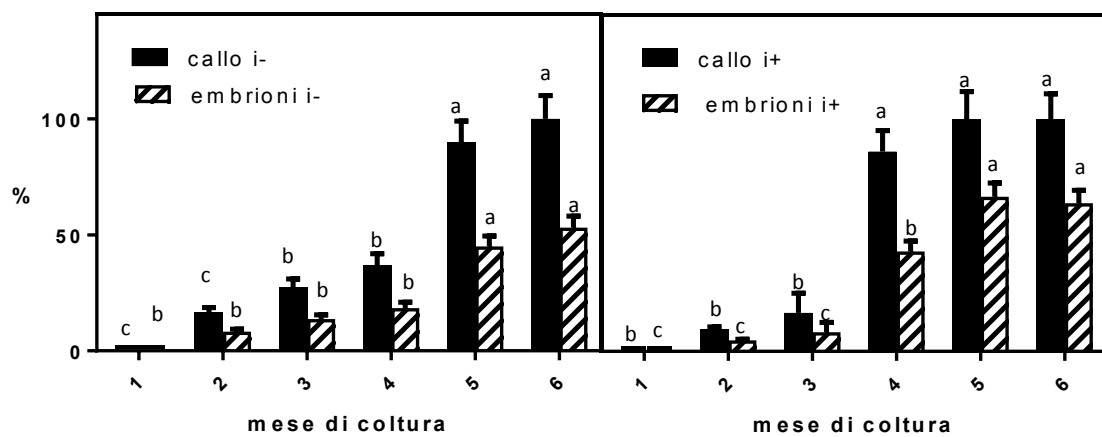


Figura 6.2.4: Analisi di due culture di callo (I- a sinistra e I+ a destra) da base fiore immaturo, destinate alla formazione di embrioni somatici, *I. pallida* Lam. Test ANOVA ad una via ($P \pm 0.05$) fra i tempi dei rilievi. A lettere diverse corrispondono medie diverse statisticamente significative.

Studio istologico degli embrioni zigotici e somatici

Dallo studio istologico dei tessuti di sezioni fini di embrioni somatici e di embrioni zigotici prodotti da colture *in vitro* di *I. pallida* è emerso che l'anatomia delle due tipologie di embrioni è simile e sovrapponibile a quella riportata in bibliografia per le specie monocotiledoni (**Figura 6.2.5**).

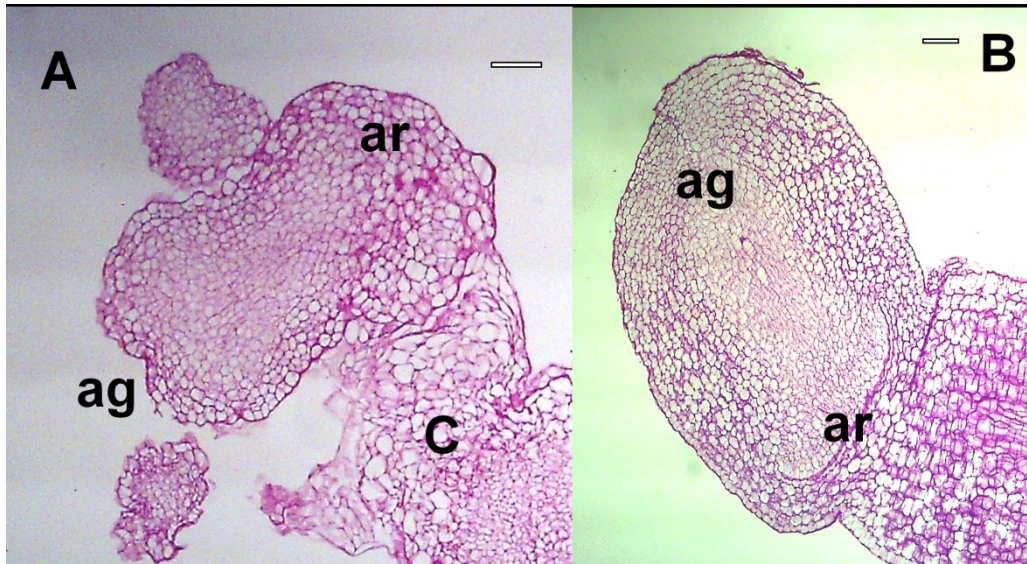


Figura 6.2.5 : Differenziazione di un embrione somatico A) e di un embrione zigotico B). Metodo di colorazione PAS. (ag=apice del germoglio; ar = apice radicale; c= cellule indifferenziate del callo) Scala di riferimento : 200 μ m

Per quanto riguarda gli embrioni somatici si possono osservare i classici stadi di sviluppo: inizialmente **cellule pro-embriogenetiche determinate** PEDC (Pre-Embryogenic Determined Cells) si formano da cellule meristematiche con citoplasma denso e grandi nuclei.

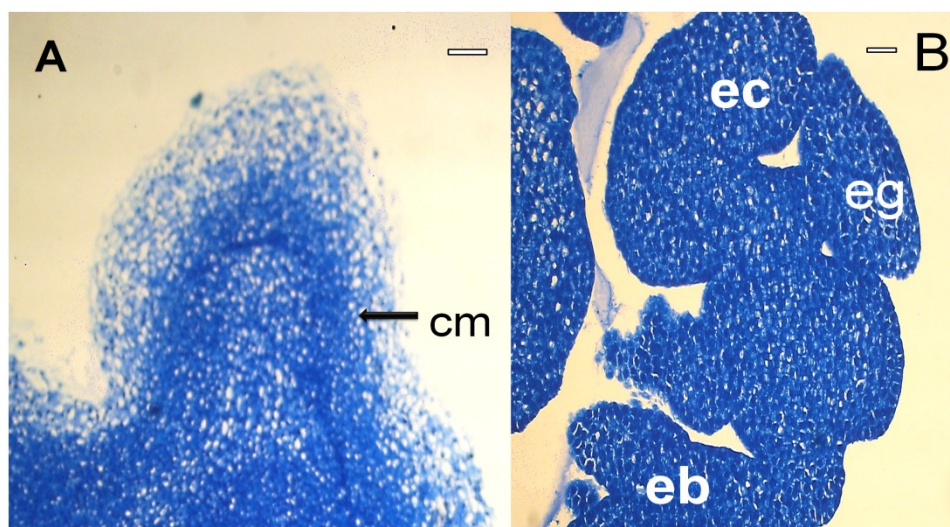


Figura 6.2.6: Formazioni pro-embionali. Metodo di colorazione Coomassie Brilliant Blu. A) abbozzo di embrione con fila di cellule meristematiche con citoplasma denso; B) embrioni a vari stadi: bipolare, a cuore e globulare. (Cellule meristematiche=cm; embrione globulare=eg; Embrione triangolare=ec; Embrione bipolare= eb) Scala di riferimento : 200 μ m

Nella **Figura 6.2.6** si può osservare che gli embrioni somatici allo stadio globulari hanno un protoderma ben visibile e si differenziano per divisione cellulare direttamente dal tessuto indifferenziato su evidenti sospensori (**Figura 6.2.7**).

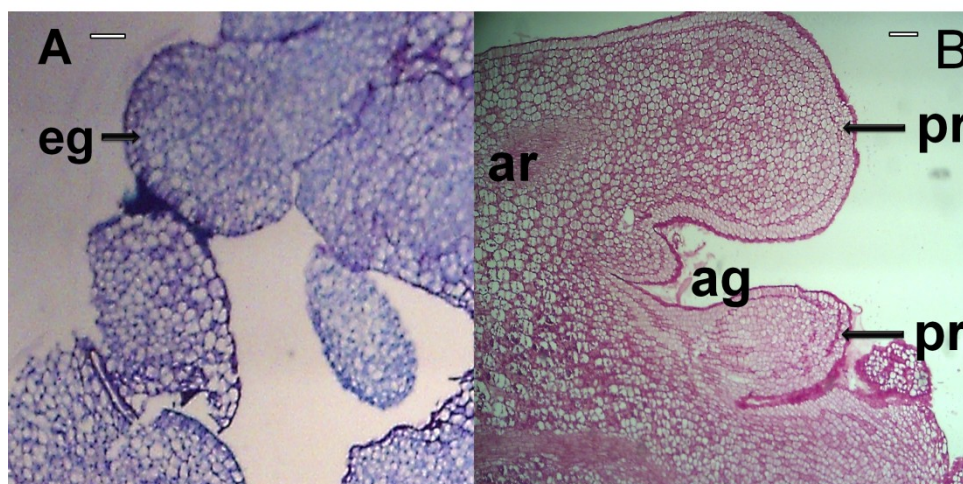


Figura 6.2.7: Pro-embrioni che si differenziano dalle masse callose. A) abbozzi di embrioni somatici (freccia) con sospensori; metodo di colorazione con Blu di Toluidina; B) abbozzi di embrioni somatici con protoderma evidente (freccia); metodo di colorazione PAS.

eg= embrione globulare; pr= protoderma; sc=scutello; ag= apice del germoglio; ar= apice radicale; s=sospensore ; c= cellule indifferenziate del callo. Scala di riferimento : 200 μ m

Lo sviluppo successivo è caratterizzato dalla formazione del nodo dello scutello. Lo scutello consiste di cellule riccamente citoplasmatiche e di forma irregolare e contenenti tracheidi a livello del procambio; è tipicamente delineato da cellule epiteliali. Infatti l'embrione somatico delle monocotiledoni, a differenza delle dicotiledoni, passa dalla forma globulare a quella in cui si differenziano scutello e coleoptile. L'apice meristemático del germoglio mostra continuità con il sistema vascolare degli apici meristemáticos del germoglio e della radice mentre non presentano connessioni vascolari con il callo (Fig. A/b). La colorazione **Coomassie** evidenzia cellule con un alto rapporto nucleo/citoplasma, come mostrato in **Figura 6.2.8**, suggerendo una intensa attività mitotica con una elevata sintesi di acidi nucleici e proteine mentre la colorazione PAS evidenzia aggregati di granuli di amido nelle cellule di callo embriogenico.

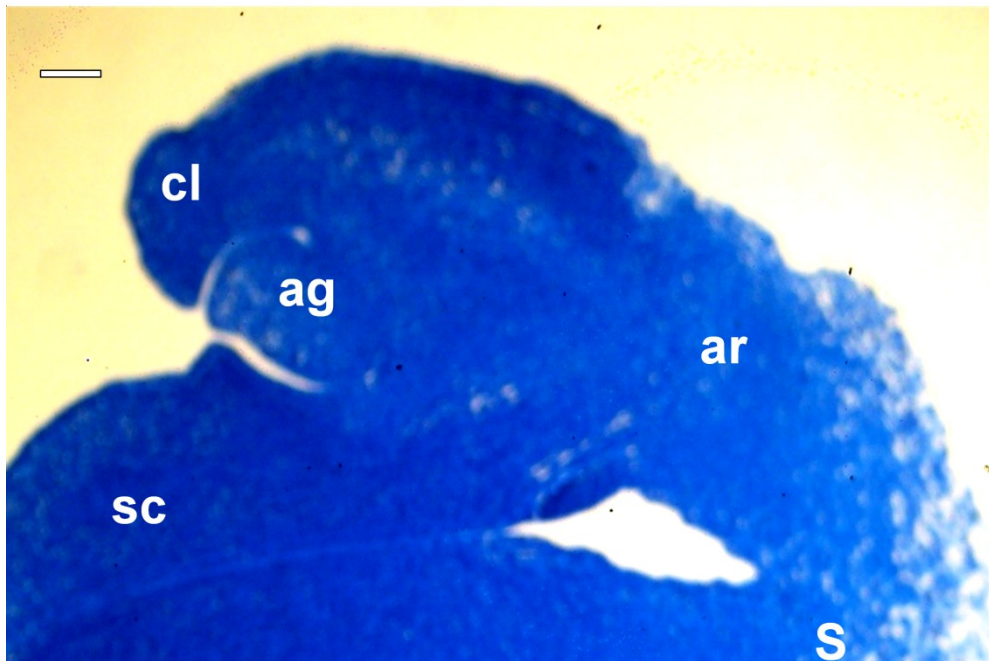


Figura 6.2.8: Embrione somatico maturo (metodo di colorazione Coomassie Brilliant Blu). cl=coleoptile; sc=scutello; ag=apice del germoglio; ar = apice radicale; s= sospensore. Scala di riferimento : 200 μ m

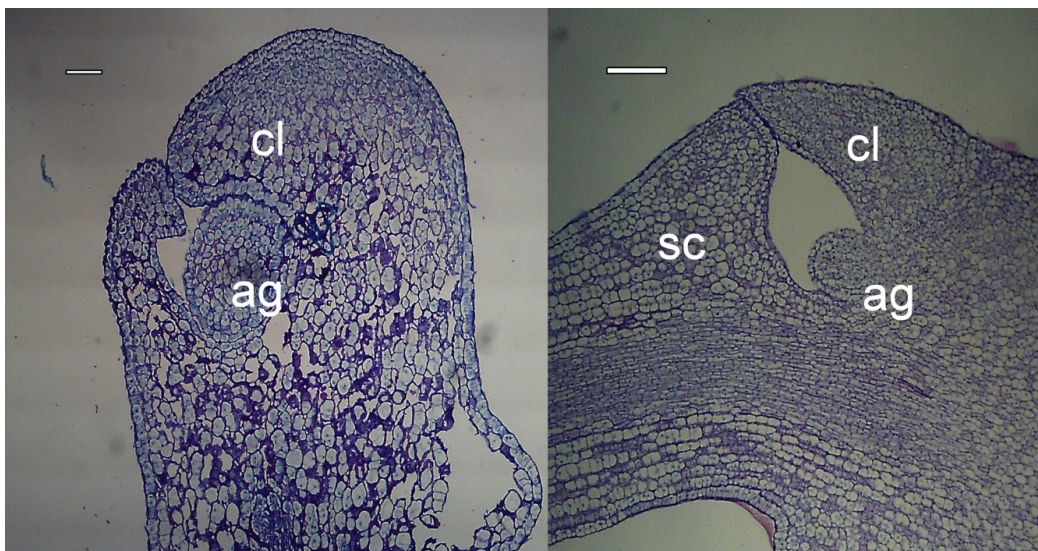


Figura 6.2.9: A) Embrione zigotico con evidente formazione del coleoptile; B) embrione somatico con struttura del coleoptile e dello scutello (ag=apice del germoglio; ar = apice radicale; sc= scutello; cl=coleoptile) Scala di riferimento : 200 μ m

I granuli di amido si dissolvono nei giovani pro-embrioni mentre appaiono nuovamente negli embrioni globulari e diventano abbondanti nelle cellule sub epidermiche degli embrioni agli stadi successivi. Il sospensore degli embrioni somatici è ricco di cellule metabolicamente attive suggerendo un suo ruolo nel fornire nutrienti all'embrione in via di sviluppo. Infine si nota una netta somiglianza nelle strutture e nelle fasi di sviluppo fra gli embrioni di origine zigotica e quelli di origine somatica (**Figura 6.2.9**). Questo risultato non permette di affermare che non esistano variazioni somaclonali tra le piante madri e cloni, ma permette di dedurre che non esistono variazioni nello sviluppo embrionale, se non quelle strettamente legate alla condizione di coltura *in vitro* (per lo più dovute all'assenza delle strutture tegumentali).

Analisi biochimica degli estratti di rizoma.

Dai risultati è possibile osservare che i profili cromatografici che sono stati ottenuti dai rizomi delle piante ottenute *in vitro* e quelle delle piante madri non differiscono sostanzialmente (**Figura 6.2.10 e 6.2.11**).

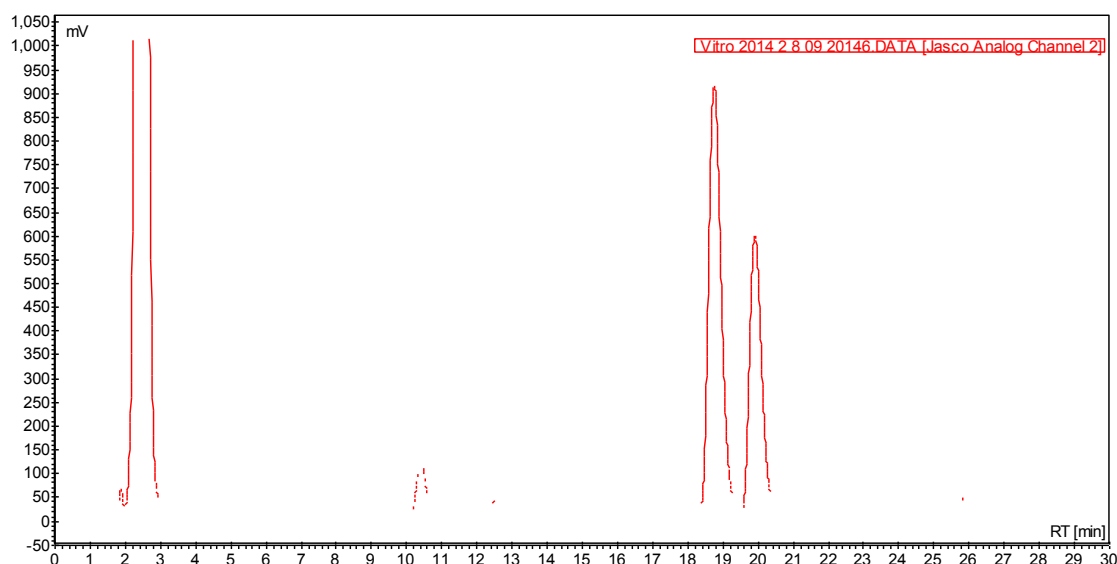


Figura 6.2.10: Cromatogramma di estratto dei rizomi di Pianta *vitro* acclimatata 2014

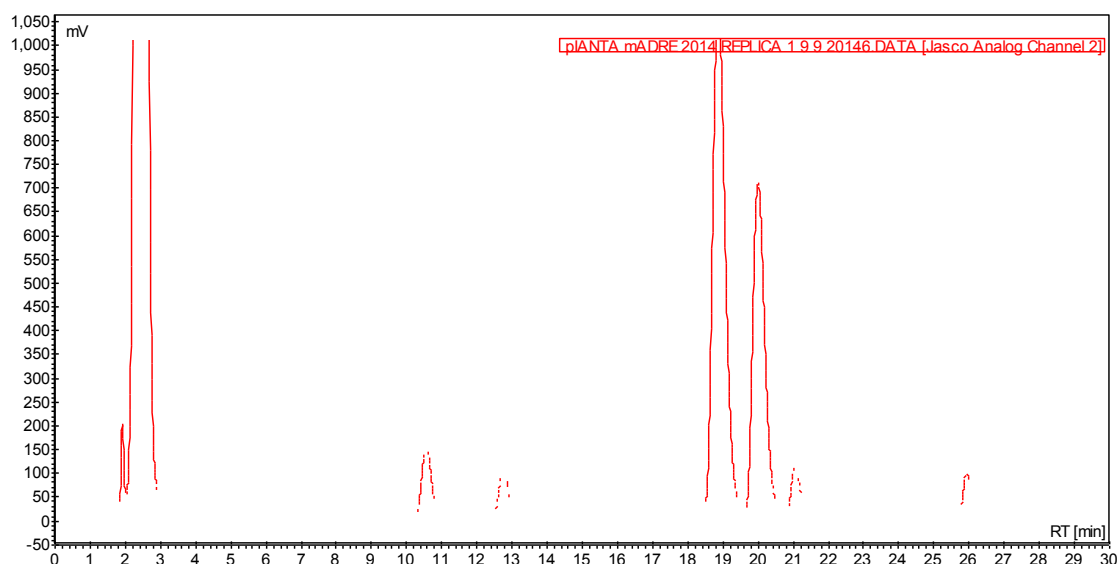


Figura 6.2.11: Cromatogramma dell'estratto dei rizomi di Pianta madre 2014

Le analisi LC-MS ed LC-MS-MS hanno mostrato che i due picchi principali presenti nei cromatogrammi, come atteso, sono attribuibili ad iridali, sia per il peso molecolare che per il tipo di frammentazione in accordo con quello già precedentemente osservato da Gozu et al. 1993 e Jehan et al. 1994. Un limite della tecnologia HPLC in questo caso è che dalla frammentazione molecolare ottenuta tramite LC-MS-MS non emergono differenze strutturali quindi non abbiamo evidenze strutturali dirette che permettano di attribuire univocamente i due picchi cromatografici ad iripallidale ed iriflorentale, tuttavia i risultati delle analisi sono coerenti con quanto riportato in letteratura. Infine l'uso della

cromatografia semipreparativa per isolare gli standard degli iridali ha permesso di quantificare in via preliminare il loro contenuto. Anche in questo caso i risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura (Bicchi et al., 1994). Dal punto di vista quantitativo, la pianta madre e quella acclimatata mostrano alcune differenze: il contenuto dell'iridale più abbondante risulta statisticamente superiore nella pianta madre, mentre quello dell'altro iridale è simile nelle due piante (**Figura 6.2.13**). Ciò può essere dovuto molto probabilmente alla diversa età delle piante in quanto la pianta madre era in coltura dall'anno precedente.

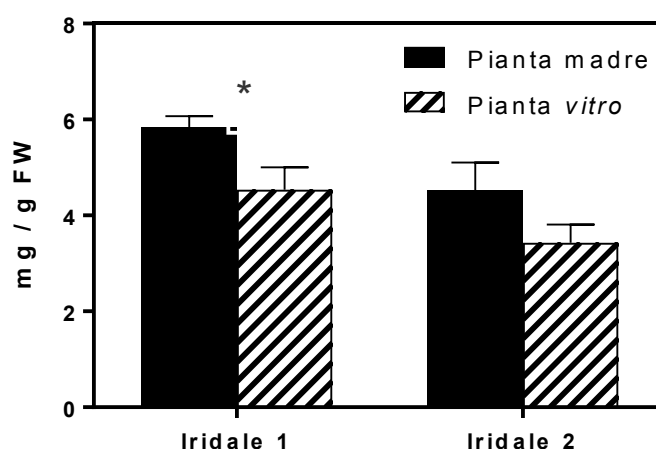


Figura 6.2.13: Concentrazione degli iridali in campioni prelevati da piante propagate con metodi tradizionali e micropropagate.

Analisi citofluorimetrica di estratti purificati di nuclei

Dopo il settaggio dello strumento sono stati analizzati campioni di *Pisum sativum* L. e *Lycopersicon esculentum* L. sia in campioni ottenuti dal tagliuzzamento separato o contemporaneo delle due specie. In questo modo abbiamo ottenuto tre istogrammi: da quelli singoli (**Figura 6.2.14** si evincono chiaramente i due picchi che corrispondono alla fase G0/G1 e G2 in entrambe le specie. Nell'analisi del campione costituito da entrambe la specie (**Figura 6.2.15**) è stato possibile: (i) distinguere con sicurezza quali picchi appartenevano al *Lycopersicon esculentum* L. e quali al *Pisum sativum* L., (ii) sulla base del peso del DNA del pomodoro è stato possibile stimare quello del pisello tramite la formula:

DNA del campione ignoto =

$[(G1 \text{ campione})/(G1 \text{ standard})] \times \text{contenuto 2C DNA standard (pg DNA)}$

descritta da Doležel, Jaroslav, and J. A. N. Bartoš (2005). Il dato emerso da questa analisi ha indicato un contenuto di DNA nel pisello pari a 8,18 pg coerentemente a quanto osservato da Praça-Fontes et al. (2011) e Cavallini et al. (1993).

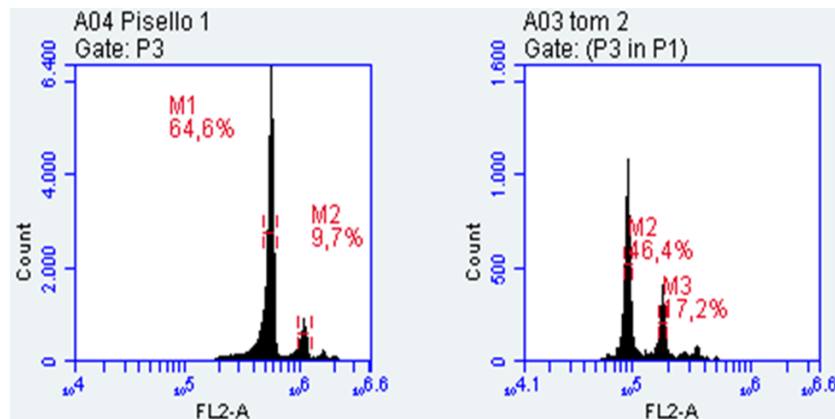


Figura 6.2.14: Istogramma uniparametrico di analisi citofluorimetrica di *Pisum sativum* L. a destra e *Lycopersicon esculentum* L. a sinistra

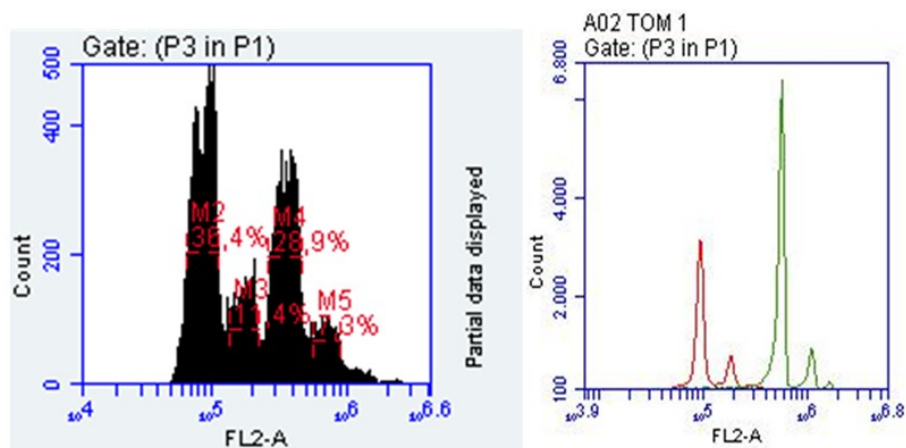


Figura 6.2.15: Istogramma uniparametrico da analisi citofluorimetrica di *Lycopersicon esculentum* L. e *Pisum sativum* L.: (i) un unico campione a destra (ii) elaborazione *in silico* dei profili dei campioni analizzati separatamente

Mantenendo lo stesso settaggio sono stati analizzati i campioni di *I. pallida* L. pianta madre e pianta *vitro* (PM e PV) separatamente. Da queste sono stati ottenuti dei grafici sovrapponibili a conferma dell'assenza di cambiamenti di ploidia indotti dalla condizione di coltura *in vitro* (**Figura 6.2.16**). Per maggiore sicurezza le foglie provenienti dalle piante madri e dalle piante *in vitro*, sono state tagliate insieme (**Figura 6.2.17**). Ne è risultato un unico picco a conferma di quanto affermato.

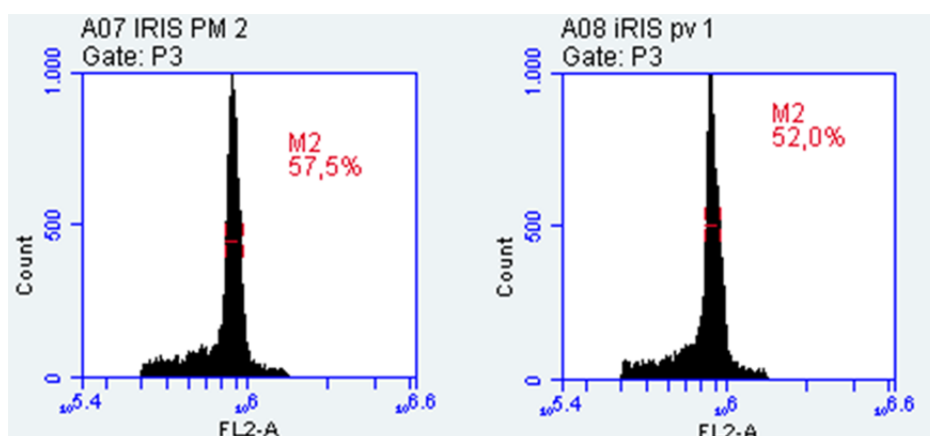


Figura 6.2.16 : Istogramma uniparametrico di *I. pallida* Lam.: pianta madre a destra e pianta *vitro* a sinistra

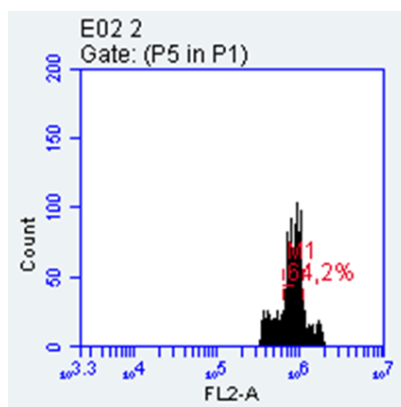


Figura 6.2.17: Istogramma uniparametrico da campioni di *I. pallida* Lam. pianta madre e pianta *vitro*

Dall'analisi di questi grafici possiamo evidenziare la presenza di un unico picco in tutti i campioni osservati, questo dato è coerente con quanto affermato da (Bharathan et al. 1993). Essendo l'*I. pallida* Lam una monocotiledone essa possiede il tessuto meristematico alla base della foglia, per cui, avendo noi utilizzato il tessuto centrale della lamina fogliare,

tutte le cellule analizzate sono risultate essere in fase G0/G1. (Bharathan et al. Nuclear DNA content of monocot, 1993).

In seguito è stata eseguita una serie di analisi destinate alla quantificazione del contenuto di DNA dell'*I. pallida* Lam., ancora sconosciuto per questa specie.

Sono stati analizzati i profili di *Lycopersicon esculentum* (2C=1,96 pg), *Ocimum basilicum* (2C=4,48 pg), *Nicotiana tabacum* (2C=9,70 pg) e *Pisum sativum* L. (dalla nostra analisi risulta: 2C=8,16).

Abbiamo usato degli standard a contenuto di DNA 2C molto eterogenei per 2 ragioni:

- Comparare sullo stesso istogramma due specie con quantità di DNA 2C molto diverse cause una diminuzione della precisione (Eliane Kaltchuk-Santos, comunicazione personale) .
- Comparando specie troppo simili si possono ottenere picchi sovrapposti che non permettono l'applicazione della formula elaborata da Doležal et al. (2005).

Secondo Doležal et al. (2005), uno standard di riferimento ideale per la quantificazione del DNA dovrebbe avere una dimensione del genoma simile a quella della specie a contenuto di DNA ignoto. Questo ci permette di trovare una relazione lineare tra specie standard e incognita (Vindeløv et al, 1983). Infatti la colorazione con propidio di ioduro può essere assorbita in maniera differente a seconda della dimensione della cromatina, per cui livelli comparabili di DNA, permettono che i nuclei reagiscano in modo simile al colorante. Un'altra importante caratteristica che lo standard deve avere è la stabilità delle dimensioni del nucleo. Ultimo, ma non per importanza il suo peso (pg) dovrebbe essere conosciuto con sufficiente precisione. Nonostante questi accorgimenti, esiste una comprovata variabilità delle stime ottenute, spesso legata all'uso di citofluorimetri diversi Doležal e Bartos (2005). Per questo motivo, dati determinati in diversi laboratori devono essere confrontati con cautela, e mai le differenze rilevate possono essere interpretate come variazione intra-specifica senza ulteriori prove.

In considerazione di ciò abbiamo deciso di eseguire un esperimento con un doppio standard interno, in grado di attestare la relazione lineare ottenuta per quantificare il contenuto di cromatina dell'*I. pallida* Lam. Dalla nostra esperienza emerge che i campioni ottenuti utilizzando gli standard più simili all'*I. pallida* Lam. (Pisello e Tabacco) si ottengono dei C-value mediamente inferiori al 5% (**Tabella 6.2.18**) a differenza del Pomodoro, che li mostra mediamente più alti. Viceversa però il pomodoro fornisce degli istogrammi più

semplici da interpretare poiché non vi sono sovrapposizioni nelle posizioni dei picchi (Figura 6.2.19).

Tabella 6.2.28: Valori di fluorescenza FL2 e C-value

Pomodoro Iris PV	Mean FL2-A	CV FL2-A
M2 (98.954,0/ 162.768,0)	129.715,95	12,88%
M3 (208.755,0/ 308.644,0)	256.070,98	10,76%
M4 (674.685,0/ 997.520,0)	823.475,40	9,96%
Tabacco Basilico Iris PV	Mean FL2-A	CV FL2-A
M1 (354.290,0 /415.393,0)	383.753,33	4,43%
M3 (724.955,0 /849.984,0)	777.014,84	3,66%
M4 (1.023.362,0/ 1.168.456,0)	1.077.601,43	2,65%
M5 (1.444.597,0/ 1.606.252,0)	1.518.310,32	2,37%
Pisello Iris PV	Mean FL2-A	CV FL2-A
M2 (561.634,0 /673.636,0)	613.521,37	4,13%
M3 (879.157,0 /1.016.584,0)	949.893,47	3,81%
M4 (1.119.941,0/ 1.326.736,0)	1.216.457,48	4,10%

L'uso di dati con un C-value inferiore del minore del 5% è la soglia ritenuta accettabile da Galbraith et al., (2002) per la stima del contenuto di DNA nelle specie selvatiche. In parti-

colare il campione più rappresentativo è risultato essere quello in cui sono stati tagliati insieme Tabacco, Basilico e *I. pallida* Lam. (PM e PV separatamente) sia in quanto i valori ottenuti mostrano dei valori di C-value molto buoni ma anche perché, stimando reciprocamente i valori del peso del DNA 2C del Tabacco e del Basilico, questi risultano identici ai quantitativi attesi come mostrato nella **Tabella 6.2.20**. Sono identici anche i risultati ottenuti per il peso di DNA 2C di *I. pallida* Lam. pianta madre (*Iris* PM) e *I. pallida* Lam. pianta *vitro* (*Iris* PV), che è risultato essere compreso tra 12,75-12,77 pg (2C). Il risultato è coerente con i dati pubblicati da Siljak-Yakovlev, S., et al. (2010) nei quali si ritrovano: *Iris pseudacorus* (1C=5,67-6,43) *Iris pumila* (1C= 6,81-6,60) e *Iris germanica* (1C=5,87-6,23) quest'ultima molto simile all'*I.pallida* Lam. Infine sono stati analizzati statisticamente i valori medi del peso di DNA per *I. pallida* pianta madre PM e pianta *vitro* PV calcolati sulla base dei valori medi delle posizioni dei picchi di PM e PV rispetto ai vari standars e ai vari esperimenti (a, b, c, d). Dall'analisi ANOVA a due vie ($P \leq 0.05$) non risultano differenze statistiche (**Figura 6.2.21**).

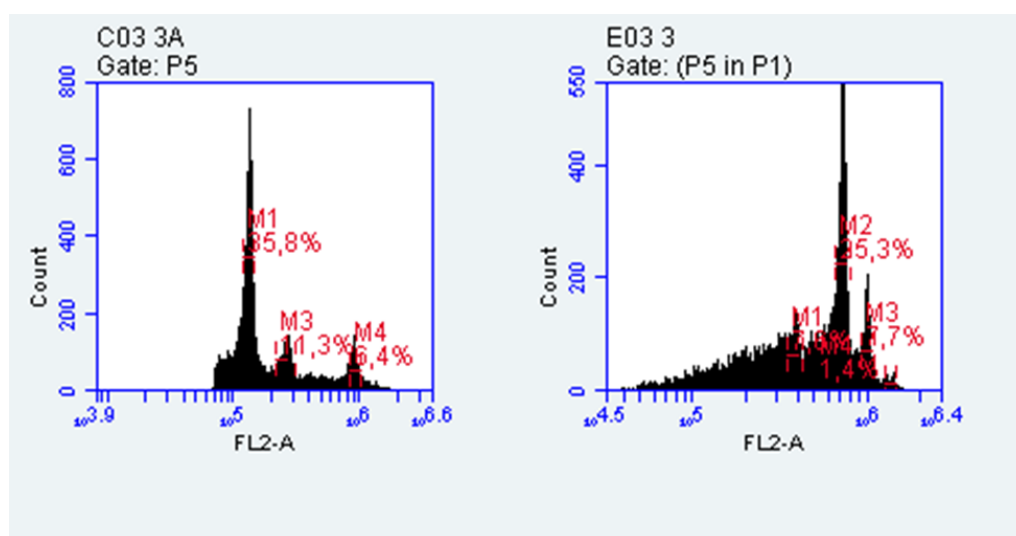


Figura 6.2.19: Istogramma monoparametrico da analisi citofluorimetrica di *I. pallida* Lam. a destra e Tabacco, Basilico e *I. pallida* Lam. a sinistra. Nel primo i picchi sono più facilmente identificabili rispetto al secondo

Tabella 6.3.20: Stima del contenuto di DNA tramite metodologia citofluorimetrica

Specie	Peack mean G0/G1	Peack mean G2	pg DNA 2C noto	pg DNA 2C incognito
Basilico	388,81		4,48	4,86
Tabacco	734,62	1401,45	9,19	9,19
<i>Iris</i> PM	1021			12,77
Basilico	383,75		4,48	4,54
Tabacco	777,01	1518,31	9,19	9,19
<i>Iris</i> PV	1077,6			12,75

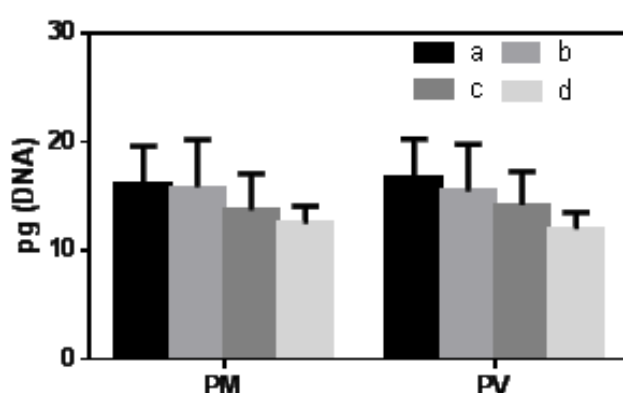


Figura 6.2.21: Analisi ANOVA a due vie ($P \leq 0.05$) dei valori medi delle posizioni dei picchi di PM e PV rispetto ai vari standards e ai vari esperimenti (a, b, c, d).

Le quantità di DNA non sono tradizionalmente riportati in pg di DNA. In seguito all'avvento della biologia molecolare c'è la tendenza ad esprimere il contenuto di DNA in termini di numero di coppie di basi (base pair, bp). La relazione, descritta da una semplice relazione lineare, parte dal presupposto che esista un rapporto 1:1 tra le coppie di Adenina-Timina e Guanina-Citosina, ignorando la presenza di nucleotidi modificati nella DNA. Considerando il rapporto 1:1 di AT: GC e ignorando la presenza di modifiche dei nucleotidi, Dolezel et al. (2003) hanno dimostrato che $1 \text{ pg di DNA} = 0,978 \times 10^9 \text{ bp}$. Gli stessi autori stimano che gli errori dovrebbero essere $<1\%$. Sfruttando questa relazione, dalle nostre analisi è risultato che il contenuto di DNA in coppie di basi è di 12478,19 Mbp.

Estrazione dell'RNA

Tramite l'estrazione con Kit Spectrum™ Plant Total RNA (Sigma, Italia) sono stati realizzati tre campioni di RNA (A,B e C). La quantità dell'RNA, in ognuno dei campioni, è risultata avere un rapporto $A260/A280 \geq 1.8$. Dal punto di vista qualitativo, l'analisi con Agilent 2100 Bioanalyzer, ha fornito un RIN (RNA integrity number) ≥ 7 , che corrisponde ad un buon livello di integrità delle sequenze. Tali parametri dimostrano che questo metodo di estrazione fornisce un RNA adatto ad essere utilizzato per la realizzazione dell'RNA-Seq.

Caratterizzazione morfologica

Dall'analisi dei dati presenti (**Tabella 6.2.22**) si evince che le tre tesi mostravano una fioritura (antesi) media del 45%. Le piante madri hanno presentato un numero di steli (per rizoma) leggermente maggiore rispetto alle piante ottenuto per micropropagazione, probabilmente perché sono state trapiantate un anno prima rispetto alle altre tesi. Il numero di boccioli fiorali, il peso (fresco e secco) e l'altezza non mostrano differenze significative. Infine è stato valutato il colore dei fiori per le tre tesi, come mostrato in **Figura 6.2.23**. Anche in questo caso non abbiamo rilevato differenze significativa. Quindi in definitiva dal nostro studio non sono emerse differenze morfologiche significative tra le piante propagate con metodi tradizionali (barbatelle) e le moderne tecniche di micropropagazione via embriogenesi somatica.

Tabella 6.2.22: Valutazione dei caratteri morfologici dell'*I. pallida* Lam. coltivate presso la sezione di Orticoltura e Floricoltura del DiSAAA-a dell'Università di Pisa

Parametri	Piante Madri	Piante Micropropagate da fiore	Piante Micropropagate da foglia
%Piante Fiorite	43,48%	45,65%	46,15%
N° steli Fiorali	2 \pm 0,19	1,75 \pm 0,48	1,5 \pm 0,29
N° boccioli per stelo	4,5 \pm 0,29	4,75 \pm 0,25	4,63 \pm 0,18
Colore Fiore	violetto	violetto	violetto
Peso fresco stelo g	83,9 \pm 5,56	72,75 \pm 2,28	83,33 \pm 6,77
Peso secco stelo g	0,74 \pm 0,06	0,63 \pm 0,01	0,73 \pm 0,07
%peso secco stelo	8,80%	8,60%	8,80%
Altezza stelo Fiorale cm	106,25 \pm 2,5	103,5 \pm 2,9	104,75 \pm 2,3

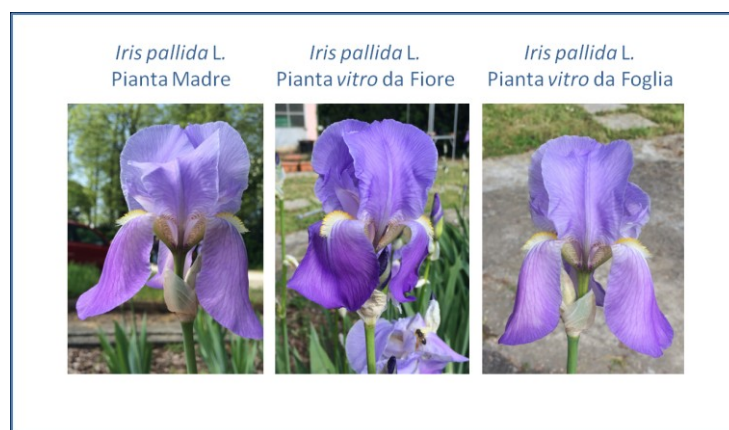


Figura 6.2.23: *I. pallida* Lam. ottenuto da propagazione tramite l'uso del rizoma (Pianta Madre), da micropropagazione via embriogenesi somatica a partire dal fiore (Pianta *vitro* da Fiore) e dalla foglia (Pianta *vitro* da Foglia)

Produzione di semi sintetici

Questo esperimento ha avuto lo scopo di valutare la possibilità di realizzare dei semi artificiali funzionali a partire dagli embrioni somatici di *I. pallida* Lam. La nostra esperienza ci ha permesso di costituire una popolazione di circa 100 plantule provenienti da semi artificiali e perciò possibile affermare che tale tecnica può essere applicata con successo all'*I. pallida* Lam. I risultati ottenuti, riportati in **Tabella 6.2.24** ci hanno permesso di valutare quale fosse la migliore condizione di conservazione e per quanto tempo è possibile conservare i semi artificiali.

Tabella 6.2.24: Dati della conservazione di embrioni incapsulati in alginato di Ca di *I. pallida* Lam. I valori (\pm ES) di ogni parametro sono stati comparati, relativamente alla temperatura di conservazione, mediante test t di Student ($P \leq 0.05$) entro ogni data di rilievo.

Mantenimento (giorni)	Imbrunimento %		Germinazione %		Germogli/Seme (N)	
	23C°	4C°	23C°	4C°	23C°	4C°
0	-	-	-	-	1,5 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1
7	9,21 \pm 0,8 *	0	66,36 \pm 2,9	63,66 \pm 6,86		
14	23,63 \pm 0,15***	9,21 \pm 0,9	66,36 \pm 2,10	80,78 \pm 8,1	0,5 \pm 0,02	0,9 \pm 0,08***
21	45 \pm 3,1****	28,12 \pm 3,6	39,23 \pm 2,9	61,87 \pm 5,5**		
28	45 \pm 3,5*	35,26 \pm 4	39,23 \pm 3,1	54,73 \pm 4,8	0,3 \pm 0,02	0,4 \pm 0,03

E' noto che basse temperature e alta umidità sono le condizioni essenziali per il mantenimento della vitalità degli incapsulati (Hegazi 2011). Dalla nostra esperienza è emerso che

conservando i semi a 4°C, la percentuale di imbrunimento degli embrioni è minore rispetto alla conservazione a 23°C. Tuttavia la germinazione non viene inibita a basse temperature, mostrando delle percentuali di germinazione più alte per i campioni conservati a 4°C. Questo dato dimostra una maggiore resistenza degli embrioni di *I. pallida* Lam. alle basse temperature rispetto ad altre specie, nelle quali un deposito a bassa temperatura (4°C) causa una drastica riduzione della vitalità (Singh et al 2006a, 2006b; Rai et al 2008) probabilmente a causa di bassi tassi di respirazione dei tessuti vegetali incapsulati (al. Kavyashree et 2006). In definitiva dalla nostra esperienza è emerso che gli embrioni di *I. pallida* incapsulati in alginato di Na hanno una buona capacità germinativa e in una subcoltura sono in grado di fornire 1,5 germogli per seme (posti sul mezzo I3). Per di più conservando i semi a 4°C possono essere mantenuti per 14 giorni abbassando il numero di germogli a 1 per seme mentre conservandoli a 23°C o per un periodo di 28 giorni tale indice diminuisce sensibilmente.

CONCLUSIONI

Lo studio riportato in questa tesi ha consentito di migliorare il livello qualitativo del protocollo di micropropagazione via embriogenesi somatica di *I. pallida* dimostrando la possibilità di ottenere un maggiore sviluppo del callo embriogenico e cloni (true-to-type) delle piante madri, nei quali non vi è l'evidenza di variazioni somaclonali, che se presenti, non sono state da noi rilevate con gli esperimenti condotti e che comunque non incidono negativamente sulla qualità delle piante ottenute. È emerso che una minore quantità di saccarosio nel mezzo di coltura di induzione, permette un maggiore sviluppo del callo durante la 3° e 4° settimana di coltura coerentemente a quanto riportato da Meyer e Van Staden (1995). Le performance del callo embriogenico, ottenuto dalla base di foglie di plantule coltivate *in vitro*, sono state valutate sia sul mezzo I1 (induzione) che I2 (espressione) e hanno mostrato che, mentre il callo continua a svilupparsi, la formazione degli embrioni diminuisce nel tempo diversamente da quanto osservato in esperimenti analoghi a partire da espianti derivanti da fiore immaturo (*in vivo*). La prolungata coltura *in vitro* delle plantule usate per allestire le colture può determinare una diversa condizione ormonale endogena. Questi dati non sono da considerarsi contraddittori, ma anzi complementari: infatti per ovviare al problema della riduzione di produzione di embrioni passati 6 mesi di coltura, si suggerisce di rinnovare annualmente (durante il periodo della fioritura dell'*I. pallida*) la coltura *in vitro*. Con questa procedura (Lucchesini et al. 2016) si possono ottenere le popolazioni di cloni *in vitro*, da usare a loro volta come fonte degli espianti primari di foglia, nei momenti dell'anno quando non sono disponibili i bocci.

Dal punto di vista morfologico non sono emerse differenze significative tra le piante propagate con metodi tradizionali e quelle micropropagate.

Lo studio istologico dei tessuti embrionali, somatici e zigotici di *I. pallida* ha confermato che l'anatomia delle due tipologie di embrioni è sovrapponibile e non esistono variazioni nello sviluppo embrionale.

Le indagini citofluorimetriche hanno confermato l'assenza di variazioni nella quantità di DNA delle piante micropropagate e la perfetta sovrapposizione dei picchi di fluorescenza di DNA fra queste e le piante madri. Il peso di DNA 2C di *I. pallida* Lam. pianta madre (Iris PM) e *I. pallida* Lam. pianta vitro (Iris PV), è risultato essere compreso tra 12,75-12,77 pg (corrispondente a 12478,19 Mbp). Questo risultato è molto simile alle stime fatte per specie evolutivamente affini a *I. pallida* (*Iris pseudacorus*, *Iris pumila* e *Iris germanica*).

Riassumendo, con il metodo descritto in questo lavoro, è stato stimato che in circa 50

giorni di coltura *in vitro*, di *I. pallida*, si ottengono 8 g di callo embriogenico, in grado di fornire in altri 20 giorni oltre 200 embrioni e quindi circa 100 piantine da acclimatare *ex vitro* (Lucchesini et al. 2016). Per di più, come confermato dalla nostra esperienza, è possibile incapsulare gli embrioni in alginato di Ca, creando dei semi artificiali che possono esser conservati a 4°C per almeno due settimane, consentendo una manipolazione degli embrioni più semplice, nonché una loro conservazione a scopi sia commerciali che tecnico-scientifici.

BIBLIOGRAFIA

1. Al Kaabi, H. H., Zaid, A., & Ainsworth, C. (2006, February). Plant-off-types in tissue culture-derived date palm (*Phoenix dactylifera* L) plants. In III International Date Palm Conference 736, 267-274.
2. Al-Zahim, M. A., Ford-Lloyd, B. V., & Newbury, H. J. (1999). Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports*, 18(6), 473-477.
3. Barcaccia, Gianni, and Mario Falcinelli. *Genetica e genomica*. Liguori, 2006.
4. Baruch, E. R., & Quak, F. (1966). Virus-free plants of *Iris* 'wedgwood' obtained by meristem culture. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 72(3-6), 270-273.
5. Bezzi, A., Vender, C., & Aiello, N. (1997). Coltivazione di ecotipi di *Gentiana lutea* L. ottenuti da seme raccolto da piante coltivate e spontanee. *ISAFI Comunicazioni di ricerca*, 96(3), 20-23.
6. Bicchi, A. (1994). On the problem of decomposing grasp and manipulation forces in multiple whole-limb manipulation. *Robotics and Autonomous Systems*, 13(2), 127-147.
7. Bogdanova, A., & Popik, V. V. (2003). Experimental and theoretical investigation of reversible interconversion, thermal reactions, and wavelength-dependent photochemistry of diazo meldrum's acid and its diazirine isomer, 6, 6-Dimethyl-5, 7-dioxa-1, 2-diaza-spiro [2, 5] oct-1-ene-4, 8-dione. *Journal of the American Chemical Society*, 125(46), 14153-14162.
8. Brar, D. S., & Jain, S. M. (1998). Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. In: *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement* (pp. 15-37). Springer Netherlands.
9. Cavallini, A., Natali, L., Cionini, G., & Gennai, D. (1993). Nuclear DNA variability within *Pisum sativum* (Leguminosae): nucleotypic effects on plant growth. *HEREDITY-LONDON*, 70, 561-561.
10. Cionini, P. G., Bennici, A., Alpi, A., & D'amato, F. (1976). Suspensor, gibberellin and *in vitro* development of *Phaseolus coccineus* embryos. *Planta*, 131(2), 115-117.
11. Dante Alighieri, *Divina Commedia*, Paradiso, Canto XVI, 152.
12. Doležel, J. (1991). Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical analysis*, 2(4), 143-154.
13. Doležel, J., & Bartoš, J. A. N. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of

- nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95(1), 99-110.
14. Doležel, J., & Bartoš, J. A. N. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95(1), 99-110.
 15. Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H., & Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 51(2), 127.
 16. Doležel, J., Kubaláková, M., Bartoš, J., & Macas, J. (2004). Flow cytogenetics and plant genome mapping. *Chromosome Research*, 12(1), 77-91.
 17. Dolezel, J., Lysak, M. A., Dolezelova, M., & Roux, N. (1997). Use of flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species. *Infomusa*, 6, 6-9.
 18. Doležel, J., Sgorbati, S., & Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia plantarum*, 85(4), 625-631.
 19. EVANS, C. T., & RATLEDGE, C. (1984). Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *Microbiology*, 130(7), 1705-1710.
 20. Fani E., 2011. Tesi: Struttura e dinamiche della filiera dell'*I. pallida* Toscana, Vincoli e opportunità per lo sviluppo locale. Università degli studi di Firenze. Facoltà di economia.
 21. Ferrari P., 1925. Il Giaggiolo (*Iris florentina*- *I. pallida* Lamk), Casa Editrice Fratelli Ottavi, Casale Monferrato. Pag. 40-87
 22. Filonova, L. H., Bozhkov, P. V., Brukhin, V. B., Daniel, G., Zhivotovsky, B., & von Arnold, S. (2000). Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science*, 113(24), 4399-4411.
 23. Fiuk, A., Bednarek, P. T., & Rybczyński, J. J. (2010). Flow cytometry, HPLC-RP, and metAFLP analyses to assess genetic variability in somatic embryo-derived plantlets of *Gentiana pannonica* Scop. *Plant molecular biology reporter*, 28(3), 413-420.
 24. Fontanili, L., Lucchesini, M., & Mensuali-Sodi, A. (2015). *In vitro* propagation and shoot encapsulation as tools for *ex situ* conservation of the aquatic plant *Ludwigia palustris* (L.) Ell. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 149(5), 855-864.
 25. Galbraith, C. G., Yamada, K. M., & Sheetz, M. P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *The Journal of cell biology*, 159(4), 695-705.

26. Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., & Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220(4601), 1049-1051.
27. Gayatri, M. C., Madhu, M., Kavyashree, R., & Dhananjaya, S. P. (2006). A protocol for *in vitro* regeneration of *Eryngium foetidum* L. *Indian Journal of Biotechnology*, 5(2), 249-251.
28. George E. D., Hall M.A., Geert-Jan De Klerk, 2008. *Plant Propagation, Tissue Culture* 3rd Edition. Springer. Pag. 382-392
29. Giménez, C., De Garcia, E., De Enrech, N. X., & Blanca, I. (2001). Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(2), 217-222.
30. Gostimsky, S. A., Kokaeva, Z. G., & Konovalov, F. A. (2005). Studying plant genome variation using molecular markers. *Russian Journal of Genetics*, 41(4), 378-388.
31. Gozu Y., Yokoyama M., Nakamura M., Namba R., Yomogida K., Yanagi M., Nakamura S., 1993. *In vitro* propagation of *I. pallida*. *Plant Cell Reports* 13:12-16
32. Greilhuber, J., & Doležel, J. (2009). 2C or not 2C: a closer look at cell nuclei and their DNA content. *Chromosoma*, 118(3), 391-400.
33. Haberlandt, Gottlieb. *Physiological plant anatomy*. Macmillan and Company, limited, 1914.
34. Hegazi AG. 2011. Viability of encapsulated shoot tips of *Capparis orientalis* Duh. *Nat Sci* 9: 223 –228.
35. Heller, F. O. (1973). DNA-measurement of *Vicia Faba* L. with pulse cytophotometry. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 86(5-9), 437-441.
36. Hussey, G., & Stacey, N. J. (1984). Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany*, 53(4), 565-578.
37. Jain, S. M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118(2), 153-166.
38. Jarret, R. L., & Gawel, N. (1995). Molecular markers, genetic diversity and systematics in *Musa*. In *Bananas and plantains* 66-83. Springer Netherlands.
39. Jéhan H., Courtois D., Ehrey C., Lerch K., Pétiard V., 1994. Plant regeneration of *I. pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. *Plant Cell Rep* 13: 671-675.
40. Karp, A. (1994). Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In *Plant cell and tissue culture*, 139-151. Springer Netherlands.

41. Krick W., Marner F.J., Jaenicke L., 1983. Isolation and structure determination of the precursors of irone and homologous compounds from *I. pallida* and *I. florentina*. *Z Naturforsch* 38:179-184.
42. Krick, W., Marner, F. J., & Janicke, L. (1984). On the stereochemistry of natural irones, dihydroirones, and their precursors. *Helvetica chimica acta*, 67(1), 318-324.
43. Kunitake, H., Koreeda, K., & Mii, M. (1995). Morphological and cytological characteristics of protoplast-derived plants of statice (*Limonium perezii* Hubbard). *Scientia horticulturae*, 60(3), 305-312.
44. Lambardi M., 2011. La ricerca in micropropagazione produce innovazione? Ivalsa, Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, CNR Fiorentino (Firenze).
45. Landi R., 1996. Effetti della popolazione coltivata, della concimazione e dei fattori ambientali sulla produzione del giaggiolo (*I. pallida* Lam.). Atti del Convegno internazionale "Coltivazione e miglioramento di piante officinali" editi dall'Istituto Sperimentale per l'Assestamento Forestale e per l'Apicoltura di Villazzano (Trento)
46. Landi R., Nicoletti M., 1997. Tecnica culturale del giaggiolo: otto anni di sperimentazione a Caspri. *Bollettino della Società Italiana dell'Iris*. 47-71
47. Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied Genetics*, 60(4), 197-214.
48. Lindsey K e Topping JF (1993) Embryogenesis: a question of patterns. *J. Exp. Bot.* 44: 359–374).
49. Linsmaier, E. M., & Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 18(1), 100-127.
50. Loureiro, J., Pinto, G., Lopes, T., Doležal, J., & Santos, C. (2005). Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta*, 221(6), 815-822.
51. Loureiro, J., Rodriguez, E., DOLEŽAL, J., & Santos, C. (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, 98(3), 679-689.
52. Lucchesini M., Bedini L., Florio F.E, Maggini R.1, Malorgio F., Pezzarossa B and Mensuali-Sodi A., (2016) *Acta Hort.* in press: The improvement of *I. pallida* propagation by somatic embryogenesis. DiSAAA-a, Viale delle Piagge 23, 56124 Pisa, Italy;
53. Lucchesini M., Mensuali Sodi A., Kiferle C., Righi A., Malorgio F., Pezzarossa B., 2011. Salvaguardia e valorizzazione di *I. pallida* Lam. dei monti del Chianti e del Pra-

- tomagno. *Acta Italus Hortus* 1: 51-54.
54. Masson, J., Liberto, E., Brevard, H., Bicchi, C., & Rubiolo, P. (2014). A metabolomic approach to quality determination and authentication of raw plant material in the fragrance field. *Iris* rhizomes: A case study. *Journal of Chromatography A*, 1368, 143-154.
 55. Meyer, H. J., & Van Staden, J. (1995). The *in vitro* production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 40(1), 55-58.
 56. Mielke K.A., Anderson W.C., 1989. *In vitro* bulblet formation in Dutch *Iris*. *HortScience* 24:1028–1031
 57. Mordhorst, A. P., Hartog, M. V., El Tamer, M. K., Laux, T., & de Vries, S. C. (2002). Somatic embryogenesis from *Arabidopsis* shoot apical meristem mutants. *Planta*, 214(6), 829-836.
 58. Mujib, A. (2005). *In vitro* regeneration of sandal (*Santalum album* L.) from leaves. *Turkish Journal of Botany*, 29(1), 63-67.
 59. Mujib, A., Banerjee, S., & Dev Ghosh, P. (2007). Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture-raised *hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations). *Propag Ornament Plants*, 7, 169-174.
 60. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
 61. Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., & Shinshi, H. (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant physiology*, 140(2), 411-432.
 62. Nehra, N. S., Kartha, K. K., Stushnott, C., & Giles, K. L. (1992). The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant cell, tissue and organ culture*, 29(3), 257-268.
 63. Ochatt, S. J. (2008). Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry part A*, 73(7), 581-598.
 64. Paoletti F., 1777. *Riflessioni sulle culture dell'Iride, negli opuscoli interessanti l'agricoltura dedicati al senatore Lorenzo Ginotti*, Firenze stamp. di Giov. Batta Stecchi e Ant. Gius. Pagani.
 65. Para, G., & Baratti, J. (1992). Irones and precursors synthesized by *Iris sibirica* tissue culture. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(7), 1132-1133.
 66. Peyvandi, F., Palla, R., Menegatti, M., & Mannucci, P. M. (2009, June). Introduction: rare bleeding disorders: general aspects of clinical features, diagnosis, and management. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 35, No. 04, pp. 349-355). ©

Thieme Medical Publishers.

67. Phinney, B. O. (1985). Gibberellin A1 dwarfism and shoot elongation in higher plants. *Biologia plantarum*, 27(2-3), 172-179.
68. Praça-Fontes, M. M., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2011). C-value reassessment of plant standards: an image cytometry approach. *Plant cell reports*, 30(12), 2303-2312.
69. Raimondi, J. P., Masuelli, R. W., & Camadro, E. L. (2001). Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses. *Scientia horticulturae*, 90(1), 19-29.
70. Randolph, L. F. (1945). Embryo culture of *Iris* seed (Vol. 1133).
71. Regione Piemonte, Museo Regionale di Scienze Naturali, 2009. *Le Iris tra botanica e storia*.
72. Righi A., 2010. Tesi: Salvaguardia e valorizzazione del giaggiolo da rizoma nella zona del Pratomagno. 21-36
73. Rodríguez, D., Keltjens, W. G., & Goudriaan, J. (1998). Plant leaf area expansion and assimilate production in wheat (*Triticum aestivum* L.) growing under low phosphorus conditions. *Plant and Soil*, 200(2), 227-240.
74. Sanderson, M. J., Baldwin, B. G., Bharathan, G., Campbell, C. S., Von Dohlen, C., Ferguson, D. & Donoghue, M. J. (1993). The growth of phylogenetic information and the need for a phylogenetic data base. *Systematic Biology*, 42(4), 562-568.
75. Sandoval, J., Kerbellec, F., Cote, F., & Doumas, P. (1995). Distribution of endogenous gibberellins in dwarf and giant off-types banana (*Musa AAA*, cv. 'Grand nain') plants from *in vitro* propagation. *Plant Growth Regulation*, 17(3), 219-224.
76. Sani G. L., Specht Goretti F., 1985. *Iris*. Seconda edizione. Edizioni Edagricole Bologna. Pag. 03-38
77. Shah, S. H., Wainwright, S. J., & Merret, M. J. (2003). Regeneration and somaclonal variation in *Medicago sativa* and *Medicago media*. *Pak J Biol Sci*, 6, 816-820.
78. Shimizu, K., Nagaike, H., Yabuya, T., & Adachi, T. (1997). Plant regeneration from suspension culture of *Iris germanica* 1. *Plant cell, tissue and organ culture*, 50(1), 27-31.
79. The Royal Horticultural Society, 1998. *Il giardinaggio (Dizionario delle piante ornamentali A-J)*. Pag. 556-558
80. Tran Thanh Van K., 1992. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis. *Acta Hort*. 314: 27-37.
81. Van der Linde PCG, Hol GMGM, Blom-Barnhoorn, van Aatrijk J, de Klerk GJ., 1988.

In vitro propagation of *Iris hollandica*. Acta Hort 226:121–128.

82. Vindeløv, L. L., Christensen, I. J., & Nissen, N. I. (1983). A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry, 3(5), 323-327.
83. von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69(3), 233-249.
84. Wang, X. F., Koyama, Y., Wada, Y., Sasaki, S. I., & Tamiaki, H. (2007). A dye-sensitized solar cell using pheophytin–carotenoid adduct: enhancement of photocurrent by electron and singlet-energy transfer and by suppression of singlet–triplet annihilation due to the presence of the carotenoid moiety. Chemical physics letters, 439(1), 115-120.
85. Wang, Y., Jeknić, Z., Ernst, R. C., & Chen, T. H. (1999). Improved Plant Regeneration from Suspension-cultured Cells of *Iris germanica* L. Skating Party'. HortScience, 34(7), 1271-1276.
86. Zimmerman, S. B., & Minton, A. P. (1993). Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 22(1), 27-65.
87. Zuccherelli, G., Venturi, V., & Damiano, C. (1978). Rapid propagation on a vast scale of Damasco 1869 rootstock by *in vitro* culture. Annali dell'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Rome (Italy).

Siti consultati:

- <http://gustarviaggiando.civico20.it>
- <http://montana.plant-life.org/families/Iridaceae.htm>
- <http://www.Plant-pictures.de>
- <http://www.ipk-gatersleben.de>
- <http://www.kew.org/>
- <http://www.mauriziovernini.wordpress.com>
- <http://www.profumeriepep.it>
- <http://www.rhs.org.uk/>
- <http://www.sagrona.it>
- <http://www.sagrona.it/Iris/Giaggiolo.jsp>
- <http://www.toscanagiaggiolo.it>
- <http://www.ufficiodeifiori.it>
- <http://zipcodezoo.com>

Ringraziamenti

La realizzazione di questa tesi è stato frutto di una collaborazione lavorativa, che negli anni, ha abbracciato diverse figure professionali di diverse are scientifiche. In particolar modo ringrazio il Prof. Fernando Malorgio, la Prof.ssa Anna Mensuali-Sodi e la Dottoressa Meriella Lucchesini, che hanno seguito il progetto di sviluppo e valorizzazione dell' *I.pallida* fin dall'inizio. Ringrazio la Dottoressa Maggini Rita per l'esperienza messa a disposizione nell'esecuzione delle analisi chimiche e la Dottoressa Evangelista Monica per l'impegno nella realizzazioni delle analisi citofluorimetriche. Sentiti ringraziamenti vanno al Dir. Alberto Pardossi, per la disponibilità concessa diversi anni fa nell'intraprendere questo meraviglioso percorso. Ringrazio l'intero team di Orticoltura: Giulia, Luca, Claudia , Alice, Eva, Stefano, Tania, Hanna, Aurelia, Walter e Riccardo. In questi ringraziamenti non può mancare il Prof. Serra per gli utili consigli. Un grande ringraziamento va ai miei genitori e mio fratello per l'aiuto e il supporto che mi hanno dato in questi anni. Ringrazio la mia compagna Angela per la capacità di sostenermi e supportarmi dimostrata in questi anni. Ringrazio gli amici e i colleghi che hanno condiviso con me il percorso universitario.

IO SPERIAMO CHE ME LA CAVO!!!